



TESE DE DOUTORAMENTO

**IDENTIFICACIÓN DE  
NOVOS BIOMARCADORES  
DE CARDIOTOXICIDADE  
EN PACIENTES DE  
CANCRO DE MAMA**

María Cebro Márquez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE  
SANTIAGO DE COMPOSTELA PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN  
MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021





D./Dna. María Cebro Márquez

Título da tese: “Identificación de novos biomarcadores de cardiotoxicidade en pacientes de cancro de mama”

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En Santiago de Compostela, 5 de maio do 2021.





## **AUTORIZACIÓN DO DIRECTORES DA TESE**

### **Identificación de novos biomarcadores de cardiotoxicidade en pacientes de cancro de mama**

D.

Dna.

D.

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna María Cebro Márquez, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reprodución de publicacións, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En ....., ... de .... de 20..



Para parte do presente estudo os medios de financiación foron os seguintes:

- Axudas para a consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas do Sistema universitario de Galicia 2019. Modalidade de grupos de referencia competitiva (GRC). XUNTA DE GALICIA.
- Axudas para a consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas do Sistema universitario de Galicia 2016. Modalidade de grupos con potencial de crecemento (GPC). XUNTA DE GALICIA.
- Monitorización da función cardíaca durante o tratamento con axentes cardiotóxicos na terapia antineoplásica. Fundación Mutua Madrileña 2014.





## AGRADECEMENTOS

---

En primeiro lugar agradecerlle aos meus directores, os doutores Ricardo Lage, Isabel Moscoso e José Ramón González Juanatey, a oportunidade que me brindaron de formar parte do Grupo CardioCHUS. En especial a Ricardo e Isa por introducirme no mundo da investigación. Os comezos poden ser duros, pero esta será a primeira dunha larga lista de teses que seguro van dirixir.

Agradecer aos equipos do servizo de Cardiología, en concreto ás doutoras Amparo Martínez e Pilar Mazón, e a Carmen Córdova; a Nieves e ao persoal de enfermería do hospital de día de Oncología; aos doutores Patricia Palacios e Rafael López do Servizo de Oncología e a Natalia Lampón do laboratorio de análise clínico do CHUS, pola súa participación e axuda no desenvolvemento deste traballo.

E por suposto, ás pacientes.

A partir de aquí creo que é xusto pedir desculpas, máis que agradecer, por aturarme durante todos estes anos. Disque son pragmática... así que isto non vai ser menos.

A Lucía Alvariño, xa que dende que apareceu polo CiMUS fainos a todos o traballo máis sinxelo. A Xulio, por axudarnos a arranxar os desarraxados. A Elena, polos consellos de irmá maior nestes últimos meses. A Cris, polos descansos e “cansos” acompañados de café. A Aitana, que caeu de repente no CiMUS, inicio do que foi despois unha conexión permanente Galicia-Canarias, e a que probablemente me avisou de todo iso que sucede nun fin de tese... E a Alexandra Elbakyan, esa valiente á que todos os predocs lle temos algo que agradecer.

Por suposto unha non concibe facer unha tese sen unha vía de escape. Aquelas rapazas da Inma, que tanto me aturaron entre canastas e entre algunha que outra escapada. Especialmente a Bea, vella coñecida, vella amiga, o meu par na cancha (ou máis ben mellor fora dela), unha mente

creativa difícil de atopar. E á doutora Davila, compañeira de “potencial” profesión, pero máis compañeira de vida, ao baloncesto teño que agradecer terme topado con ela.

A Rita, moito lle teño que agradecer (ou pedir desculpas) neste último camiño. Enlace laboral ben acordado, o que comezou por mera casualidade converteuse nun apoio sen o cal sería moi complicado chegar a onde estou. A Anael, ese dobre laranxa cun humor (e un mal humor) tan parecido ao meu que ás veces da medo. E a Lorena, esas (poucas) tardes “tésicas” de escritura conxunta foron elixir nas longas semanas de teclear sen ver o fin. As seguintes sodes vos!

Alba e Lucía, dúas das de sempre, sempre elas, sempre estando, sempre desexando velas. A Nuria, esa irmá doutro sangue, a que me axudou a lidar comigo mesma, axuda que foi fundamental neste longo proceso. A Marinela, porque compartir este proceso cunha amiga faino máis doado, e a pesar de que sinto orgullo polo que está a conseguir nesta carreira de fondo, moito me vai costar esquecerme de que me “abandonase” na recta final. Pronto Lourd, pronto... A Carlota, por ser a primeira que foi, por ser sempre.

Á familia. A Pa por eses “aínda non acabaches?”, e a Ma, muller brava. O apoio incondicional duns pais dificilmente se pode reflexar en palabras. Non sería eu sen ese irmán tan diferente a min, que equilibra os meus defectos, gracias por ser Manuel. E a Floki e a Ziggy, que boa compañía me fixeron nos longos días de escritura.

E por último a Jorge, o que máis me aturou, ese apoio constante e continuo. Quen che ía a dicir que ías pasar por isto (porque tamén pasaches), vas ter que facer unha tese para devolverche todo o que fixeches por min. Ou mellor non a fagas... Cunha basta. Isto xa se acaba!

Cando no medio da escritura fun pensando de vez en cando nas persoas que estiveron comigo, nese momento xusto debín de plasmalo sobre o papel. A todos os que nalgún momento estiveron, gracias.

*“Faino ou non o fagas,  
pero non o intentes”*



## ABREVIATURAS

---

adipoQ: adiponectina  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario  
Akt: proteína kinasa B (*Protein kinase B*)  
AMPc: adenosín monofosfato cíclico  
AMPK: proteína kinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)  
ANP: péptido natriurético auricular (*Atrial natriuretic peptide*)  
APS: persulfato amónico (*persulfato amónico*)  
ARAI: antagonistas do receptor de angiotensina II  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensaxeiro  
ATF6 $\alpha$ : factor de transcripción activador 6  $\alpha$  (*activating transcription Factor 6  $\alpha$* )  
ATP: adenosina trifosfato  
AUC: área baixo a curva (*area under the curve*)  
AV: anexina V  
BiP: proteína de unión a inmunoglobulina (*binding immunoglobulin protein*)  
BNP: péptido natriurético cerebral (*brain natriuretic peptide*)  
BRCA1/2: xenes 1 e 2 do cancro de mama (*Breast Cancer 1/2*)  
BSA: albúmina de soro bovino (*bovine albumin serum*)  
CAT: catalasa  
CDTX: cardiotoxicidade  
CHOP: proteína homóloga da proteína de unión ao potenciador de CCAAT (*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*)  
curva ROC: Curva característica operativa do receptor (*receiver operating characteristic curve*)  
CV: cardiovascular  
DE: desviación estándar

DEPC: dietil policarbonato  
DHE: dihidroetidio  
DM: diabetes mellitus  
DMSO: dimetil-sulfóxido  
DOX: doxorubicina  
DTX: docetaxel  
EAC: enfermidade arterial coronaria  
ECG: ecocardiograma  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EE: erro estándar  
EGTA: ácido egtaico (*ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*)  
eIF2α: factor de iniciación eucariota 2α (*Eukaryotic Initiation Factor-2 2α*)  
ELISA: ensaio por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)  
ErbB: Receptor do factor de crecemento epidérmico  
ERE: estrés de retículo endoplasmático  
EROs: especies reactivas de osíxeno  
FABP4: proteína de unión a ácidos graxos 4 (*fatty acid binding protein-4*)  
FAM: carboxifluoresceína (colorante indicador (*reporter dye*))  
FEVE: fracción de exacción do ventrículo esquerdo  
FITC: fluoresceína-5-isotiocianato  
FoxO: proteína FOX (*forkhead box*) O  
GADD34: proteína de arresto do crecemento e inducible por danos no ADN 34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*)  
Gal-3: galectina 3  
GDF-15: factor de diferenciación do crecemento-15 (*growth differentiation factor-15*)  
GPx: glutatión peroxidasa  
GSEA: análise de enriquecemento de sets de xenes (*Gen Set Enrichment Analysis*)  
HbA1c: hemoglobina glucosilada  
HBSS: solución salina balanceada Hanks (*Hanks Balanced Salt Solution*)

HDL: lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein*)  
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico  
HER2/3: receptor do factor de crecemento epidérmico humano 2 (*human epidermal growth factor receptor*)  
HIF1: factor inducible por hipoxia (*hypoxia-inducible factor 1*)  
HRP: peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)  
HTA: hipertensión arterial  
HUVEC: células endoteliais de la vena umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)  
I/R: isquemia/reperfusión  
IC: insuficiencia cardíaca  
I.C.: intervalo de ionfianza  
ICC: IC crónica  
iECA: inhibidores da ezima convertidora de anxiotensina  
IL: interleukina  
IM: infarto de miocardio  
IMC: índice de masa corporal  
IP: ioduro de propidio  
KEGG: enciclopedia de xenes e xenomas de Kioto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database*)  
LDL: lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein*)  
LED: diodos emisores de luz (*light-emitting diode*)  
MAPK: proteínas kinasas activadas por mitóxenos (*mitogen-activated protein kinases*)  
MCPIP: proteína inducida por MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1-induced protein*)  
MGB: unión ó suco menor (*minor groove binder*)  
microARN: micro ácido ribonucleico  
mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero (*mammalian Target of Rapamycin*)  
MTT: bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazolio  
MUGA: adquisición múltiple cerrada (*multigated acquisition*)  
NAC: N-acetil cisteína  
NFκB: factor nuclear potenciador das cadeas lixeiras kappa das células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NFQ: apagador non fluorescente (*non fluorescent quencher*)  
NOX: NADPH-oxidasa  
OMT: omentina  
PBMCs: Células mononucleadas do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononucleated Cells*)  
PBS: solución salina tamponada con fosfato (*phosphate puffered paline*)  
PCR: reacción en cadea dad polimerasa (*reacción en cadea da polimerasa*)  
P.C.R.: proteína C reactiva  
PDGF: factor de crecemento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor*)  
peIF2 $\alpha$ : factor de iniciación eucariota 2 $\alpha$  fosforilado (*Phosphorylated Eukaryotic Initiation Factor-2 2 $\alpha$* )  
PERK: proteína kinasa retículo endoplasmático similar a ARN kinasa (*protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*)  
PI3K-Akt: fosfatidilinositol 3 kinasa-RAC $\alpha$  serina/treonina-proteína kinasa (*phosphatidylinositol 3-kinases-RAC $\alpha$  serine/trheonine-protein kinase*)  
pro-BNP: pro-péptido natriurético cerebral (*pro-brain natriuretic peptide*)  
Prx4: peroxiredoxina-4  
qPCR: PCR en tempo real ou cuantitativa  
RAAS: sistema renina-anxiotensina-aldosterona  
Raf1: RAF-1 proto-oncoxen, serina/treonina kinasa  
RE: retículo endoplásmico  
RISC: complexo silenciador inducido por ARN (*RNA-induced silencing complex*)  
RPM: revolucións por minuto  
RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute (*Roswell Park Memorial Institute medium*)  
SBF: soro bovino fetal  
SCORE: avaliación do risco coronario sistémico (*Systemic Coronary Risk Evaluation*)  
SDS-PAGE: electroforese en xel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SERCA: sarco/retículo endoplásmico  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa  
 (Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase)  
 SGL: *strain* global lonxitudinal  
 SOD: súper óxido dismutasa  
 SP1: factor de transcripción proteína específica 1 (*specificity protein 1*)  
 ST2: tipo 1 do receptor de interleukina-1 (*interleukin-1 receptor-like 12*)  
 TBS: solución tamponada con tris (*tris-buffered saline*)  
 TEMED: tetrametiletildiamina  
 TG: triglicéridos  
 TGF $\beta$ : factores de crecimiento tumoral  $\beta$  (*tumor growth factor  $\beta$* )  
 TNF: factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*)  
 TnI: troponina I  
 Tris/Tris-HCl: trisaminometano/trisaminometano-hidróclorido  
 Tto: tratamiento  
 UPR: reposta a proteínas despregadas (*unfolded protein response*)  
 UV: ultravioleta  
 VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)  
 Wnt: sitio de integración relacionado con Wingless (*Wingless-related integration site*)  
 XBP1: proteína de unión X-box 1 (*X-box binding protein 1*)



<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1 CARDIOTOXICIDADE NO CANCRO DE MAMA .....</b>	<b>30</b>
1.1.1 EPIDEMIOLOXÍA .....	31
1.1.2 OPCÍONS TERAPÉUTICAS FRONTE O CANCRO DE MAMA .....	31
1.1.2.1 Quimioterapia: mecanismos de CDTX. ....	32
1.1.3 RADIOTERAPIA .....	36
<b>1.2 MANIFESTACÍONS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DA CDTX.....</b>	<b>37</b>
1.2.1 DIAGNÓSTICO .....	37
1.2.1.1 Imaxe .....	38
1.2.1.2 Marcadores séricos .....	43
1.2.2 ESTRATEXIAS DE PREVENCIÓN E TRATAMENTO .....	45
1.2.2.1 Factores de risco CV .....	46
1.2.2.2 Dano por radioterapia .....	46
1.2.2.3 Dano por quimioterapia .....	47
<b>1.3 OUTROS FACTORES DE DETERMINAN CDTX .....</b>	<b>48</b>
1.3.1 XENÉTICA .....	48
1.3.1.1 Bioxénese dos microARNs .....	48
1.3.1.2 microARNs circulantes .....	50
1.3.1.3 microARNs en <i>PBMCs</i> .....	50
1.3.1.4 Papel dos microARNs na patoloxía CV .....	51
1.3.1.5 Papel dos microARNs na CDTX .....	52
1.3.2 PERFIL METABÓLICO .....	52
<b>2 OBXECTIVOS .....</b>	<b>60</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1 ESTUDOS CLÍNICOS.....</b>	<b>64</b>
3.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN E EXCLUSIÓN .....	64
3.1.2 DATOS CLÍNICOS E RECOLLIDA DE MOSTRAS .....	64
3.1.2.1 Datos clínicos .....	65
3.1.3 POBOACIÓN DE ESTUDO .....	66
3.1.3.1 Obtención de plasma .....	67
3.1.3.2 Illamento de <i>PBMCs</i> .....	67
3.1.4 ESTUDO DO PATRÓN DE EXPRESIÓN DOS MICROARNs .....	68
3.1.4.1 Extracción de microARNs do plasma e <i>PBMCs</i> .....	68
3.1.4.2 Cuantificación microARNs .....	69
3.1.4.3 Secuenciación microARNs .....	70

3.1.4.4 Validación de microARNs de plasma e análise do patrón de expresión dos microARNs no plasma e <i>PBMCs</i>	70
3.1.5 PREDICIÓN DE DIANAS DOS MICROARNs ( <i>TARGETING</i> ) E ANÁLISE DE ENRIQUECEMENTO DE SETS DE XENES ( <i>GSEA</i> )	74
3.1.6 ESTUDO DE ADIPOKINAS EN PLASMA	75
3.1.6.1 Ensaio por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	75
3.1.6.2 LUMINEX	76
<b>3.2 ESTUDOS <i>IN VITRO</i></b>	<b>78</b>
3.2.1 CULTIVO CELULAR E REACTIVOS	78
3.2.2 VIABILIDADE CELULAR	79
3.2.3 CITOMETRÍA DE FLUXO	79
3.2.3.1 Análise de apoptose	79
3.2.3.2 Análise de especies reactivas de osíxeno (EROs)	80
3.2.4 ANÁLISE DE EXPRESIÓN XÉNICA	80
3.2.4.1 Extracción de ARN e cuantificación	80
3.2.4.2 Retrotranscripción	81
3.2.4.3 PCR en tempo real (qPCR)	82
3.2.5 ANÁLISE DE EXPRESIÓN PROTEICA	83
3.2.5.1 Extracción de proteína e cuantificación	83
3.2.5.2 Western blot	84
<b>3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICO</b>	<b>87</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>90</b>
<b>4.1 ESTUDOS CLÍNICOS</b>	<b>90</b>
4.1.1 CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES	90
4.1.1.1 Características basais da cohorte inicial	90
4.1.1.2 Características da poboación de estudo	91
4.1.2 SECUENCIACIÓN DOS MICROARNs PRESENTES NO PLASMA	94
4.1.3 VALIDACIÓN POR RT-QPCR DOS MICROARNs EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE	96
4.1.3.1 Diferencias de expresión previas ao tratamento quimioterápico.	96
4.1.3.2 Cambios no perfil de expresión durante o tratamento quimioterápico.	103
4.1.4 ESTUDO DE <i>TARGETING</i> E <i>GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS</i> ( <i>GSEA</i> )	108
4.1.4.1 Estudo de predición de diana e rutas enriquecidas asociadas ás diferencias previas ao tratamento quimioterápico.	109
4.1.4.2 Estudo de predición de dianas e rutas enriquecidas asociadas aos cambios no perfil de expresión durante o tratamento quimioterápico	111



4.1.5	ESTUDO DOS NIVEIS DE ADIPOKINAS DAS PACIENTES	113
4.1.5.1	Determinación de adipokinas circulantes	113
4.1.5.2	Correlación das adipokinas cos parámetros ecocardiográficos de CDTX subclínica.	114
4.1.5.3	Correlación das adipokinas cos microARNs expresados diferencialmente en plasma.	117
<b>4.2</b>	<b>PROTECCIÓN DA OMT EN CÉLULAS H9C2 TRATADAS CON DTX....</b>	<b>121</b>
4.2.1	EFFECTOS DO DTX NA VIABILIDADE DE H9C2	121
4.2.2	EFFECTOS DO COTRATAMENTO OMT-DTX NA VIABILIDADE EN H9C2	122
4.2.3	EFFECTOS DO DTX E OMT NA APOPTOSE EN H9C2	122
4.2.4	EFFECTO DA OMT E O DTX NA ACTIVACIÓN DA CASPASA-3	123
4.2.5	EFFECTOS DA OMT NA PRODUCCIÓN DE EROS INDUCIDA POR DTX	124
4.2.5.1	Expresión xénica e proteica de enzimas antioxidantes	126
4.2.5.1	Expresión de NADPH oxidasas	127
4.2.6	EFFECTOS DA OMT E O DTX NO ERE	128
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>134</b>
<b>5.1</b>	<b>IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE TOXICIDADE SUBCLÍNICA EN PACIENTES CON CANCRO DE MAMA.....</b>	<b>136</b>
5.1.1	VALORACIÓN DAS CARACTERÍSTICAS GRUPOS DE ESTUDO	136
5.1.2	PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICROARNs	138
5.1.2.1	Diferencias de expresión previas ao tratamento quimioterápico	138
5.1.2.2	Diferencias de expresión ao longo do tratamento quimioterápico	139
5.1.2.3	Estudo de targeting	145
5.1.3	ADIPOKINAS E CDTX	148
<b>5.2</b>	<b>EFFECTO DA OMT SOBRE A CDTX NUN MODELO <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>151</b>
5.2.1	VIABILIDADE E APOPTOSE ASOCIADAS AO TRATAMENTO CON DTX/OMT	151
5.2.2	ESTRÉS OXIDATIVO E OMT	152
5.2.3	ESTRÉS DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E OMT	153
<b>6</b>	<b>CONCLUSIÓNS .....</b>	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>164</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>188</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ranking de cancros diagnosticados en mulleres no 2020...	29
Figura 2. Factores a considerar na estratificación de risco en pacientes con tratamento antineoplásico potencialmente cardiotoxico.....	31
Figura 3. Mecanismos de CDTX activados por antraciclina..	33
Figura 4. Dano cardíaco producido por radioterapia.....	37
Figura 5. Progresión da CDTX segundo os biomarcadores .....	38
Figura 6. Rangos de disfunción CV. ....	39
Figura 7. Representación esquemática da deformación miocárdica durante a contracción.....	42
Figura 8. Esquema xeral da bióxénese dos microARNs .....	49
Figura 9. Cronoloxía do esquema de recollida de mostras e estudo ecocardiográfico .....	65
Figura 10. Diagrama de fluxo do deseño dos grupos de estudo. ....	67
Figura 11. Electrorferograma típico da cuantificación de microARNs no Bioanalyzer. ....	70
Figura 12. Proceso de síntese do ADNc a partir de microARNs. ....	71
Figura 13. qPCR TaqMan.....	73
Figura 14. HeatMap da secuenciación dos microARNs.....	95
Figura 15. Expresión de microARNs en plasma antes do tratamento quimioterápico .....	98
Figura 16. Curvas COR dos microARNs expresados diferencialmente en plasma antes do tratamento quimioterápico.....	99
Figura 17. Expresión de microARNs en PBMCs antes do tratamento quimioterápico. ....	101
Figura 18. Curvas COR dos microARNs expresados diferencialmente en PBMCs antes do tratamento quimioterápico.....	102
Figura 19. Patrón de expresión diferencial dos microARNs a nivel basal en plasma e PBMCs.....	102
Figura 20. Expresión de microARNs en plasma en pacientes que desenvolven CDTX subclínica durante o tratamento quimioterápico. ....	104
Figura 21. Curvas COR dos microARNs regulados diferencialmente en plasma en pacientes que desenvolven CDTX subclínica durante o tratamento quimioterápico.....	105

Figura 22. Expresión de microARNs en PBMCs en pacientes que desenvolven CDTX subclínica durante o tratamento quimioterápico. ....	106
Figura 23. Curvas COR do microARN regulado diferencialmente en PBMCs en pacientes que desenvolven CDTX subclínica durante o tratamento quimioterápico. ....	107
Figura 24. Patrón de expresión diferencial dos microARNs a nivel lonxitudinal en plasma e PMBCs. ....	107
Figura 25. Patrón de expresión diferencial dos microARNs a nivel lonxitudinal en plasma das pacientes que non desenvolven CDTX subclínica. ....	108
Figura 26. Tamaño dos sets (xenes diana dos microARNs). ....	109
Figura 27. Estudo de targeting dos microARNs significativos en plasma a nivel basal. GSEA en rutas KEGG. ....	110
Figura 28. Tamaño dos sets (xenes diana dos microARNs) ....	110
Figura 29. Estudo de targeting dos microARNs significativos en PBMCs a nivel basal. ....	111
Figura 30. Tamaño dos sets (xenes diana dos microARNs). ....	112
Figura 31. Estudo de targeting dos microARNs significativos en plasma a nivel basal. ....	112
Figura 32. Estudo de targeting dos microARNs significativos en PBMCs a nivel lonxitudinal. ....	113
Figura 33. Niveis de adipokinas circulantes nivel basal. ....	114
Figura 34. Curva COR e correlación da OMT coa variación da %SGL. ....	115
Figura 35. Curva COR e correlación da AdipoQ coa variación da %SGL. ....	116
Figura 36. Correlación de Gal3 coa variación da %SGL. ....	117
Figura 37. Correlación da OMT cos microARNs ....	118
Figura 38. Correlación da AdipoQ cos microARNs ....	119
Figura 39. Correlación da Gal3 cos microARNs ....	120
Figura 40. Dose-resposta do DTX en células H9c2. ....	121
Figura 41. Efecto de DTX e OMT na apoptose ....	122
Figura 42. Efecto do DCT e OMT na apoptose. ....	123
Figura 43. Niveis de caspasa-3 en células H9c2 tratadas con DTX e/ou OMT. ....	124

Figura 44.Efectos da OMT e/ou DTX na produción de EROs.....	125
Figura 45. Expresión xénica de enzimas antioxidantes.....	126
Figura 46. Expresión xénica de enzimas antioxidantes.....	127
Figura 47. Efecto da OMT e/ou DTX na expresión de NOX4.....	128
Figura 48. Expresión xénica de proteínas RE.....	129
Figura 49. Expresión proteica do RE .....	130
Figura 50. Esquema da gradación da CDTX.....	138
Figura 51. Mecanismo de CDTX inducido por DTX.....	155





## ÍNDICE DE TÁBOAS

---

Táboa 1. Gradación da CDTX segundo o rexistro CARDIOTOX.....	41
Táboa 2. Ciclos de temperaturas para a obtención do ADNc.....	72
Táboa 3. Ciclos de temperaturas empregados para a qPCR. ....	73
Táboa 4. Sondas TaqMan utilizadas e bibliografía empregada para a súa elección. ....	74
Táboa 5. Concentración utilizadas nos inmunoensaios. ....	77
Táboa 6. Reactivos utilizados nos tratamentos celulares. ....	78
Táboa 7. Ciclos de temperaturas da retrotranscripción. ....	82
Táboa 8. Reactivos utilizados en cada reacción de qPCR.....	82
Táboa 9. Cebadores específicos para cada xen.....	82
Táboa 10. Composición do tampón de lise celular.....	83
Táboa 11. Tampón de carga para a electroforese. ....	84
Táboa 12. Composición dos xeles para a electroforese.....	85
Táboa 13. Composición do tampón de electroforese. ....	85
Táboa 14. Composición do tampón de transferencia. ....	85
Táboa 15. Anticorpos utilizados para a inmunodetección por Western Blot .....	86
Táboa 16. Características basais da cohorte inicial .....	90
Táboa 17. Características basais dos grupos de estudo.. ....	93
Táboa 18. Resultados da secuenciación dos microARNs.....	188





# INTRODUCCIÓN





## 1 INTRODUCCIÓN

O cancro de mama é o tipo de cancro máis diagnosticado entre as mulleres a nivel mundial (Figura 1), contando co 24,5% de novos casos de cancro no ano 2020, estatística que se reproduce en Europa cun 28,7% e en España cun 24,6%<sup>1</sup>.

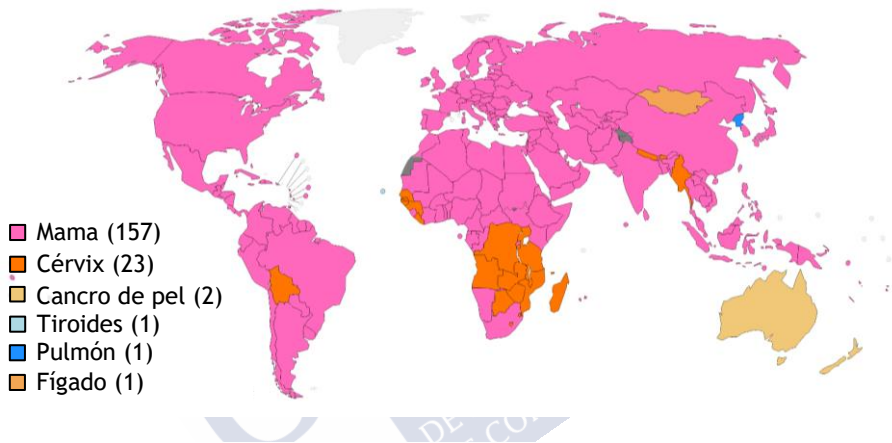


Figura 1. Ranking de cancros diagnosticados en mulleres no 2020. Tipo de cancro (países). Adaptado de GLOBOCAN 2020, Axencia Internacional de Investigación do Cancro (IARC) 2021.

Os últimos avances no cribado, no diagnóstico temperá e na eficacia dos axentes anticanceríxenos están sendo de gran importancia para a mellora da supervivencia das pacientes con cancro de mama<sup>2</sup>. Actualmente, nunha grande proporción de mulleres, pode considerarse unha enfermidade crónica cunha proporción de sobreviventes a longo prazo cada vez maior, estimada nun 70%<sup>3</sup>. Como consecuencia disto, somos cada vez mais conscientes do que o tratamento antineoplásico pode causar no sistema cardiovascular (CV), en ocasións anos despois de recibir o tratamento anticanceríxeno. Hoxe sábese que as enfermidades CV, en moitos casos, son a causa de morte entre mulleres con cancro de mama debido aos efectos secundarios das terapias anticanceríxenas<sup>2</sup>.

### 1.1 CARDIOTOXICIDADE NO CANCRO DE MAMA

A terapia anticancerixena está, en xeral, deseñada para interferir na división das células neoplásicas, podendo inevitablemente afectar a outros tecidos ou órganos sans. Cando a toxicidade ocorre en tecidos que se dividen rapidamente as consecuencias a longo prazo son mínimas, pola contra a capacidade de rexeneración do corazón humano é limitada, polo que se incrementa a susceptibilidade de sufrir efectos adversos a longo prazo<sup>4</sup>. Enténdese a cardiotoxicidade (CDTX) como o conxunto de eventos CV adversos derivados do tratamento oncolóxico. Estes, en función da gravidade, poden supor a interrupción do tratamento antineoplásico.

Neste contexto, xurde a cardio-oncología, co fin de previr e minimizar a interrupción do tratamento contra o cancro e os potenciais efectos adversos sobre o sistema CV. A previsión da CDTX pasa por unha estreita monitorización do paciente e unha adecuada estratificación do risco. Faise entón necesario un control dos factores de risco CV en pacientes que reciben terapia anticancerixena previo ao tratamento. Aínda que distintos estudos establecen unha serie de factores de risco a ter en conta, non existe un consenso instaurado nos protocolos de práctica clínica para valorar estes parámetros de maneira rutinaria antes ou durante o tratamento quimioterápico, o que dificulta a adecuada estratificación dos pacientes<sup>5</sup>. Un traballo recente do Grupo de Cardio-Oncología da Sociedade Europea de Cardiología recolle as variables clínicas e demográficas necesarios para estratificar o risco en pacientes que van recibir fármacos anticancérxenos portencialmente cardiotóxicos (Figura 2): enfermidade CV ou tratamento cardiotóxico previo, biomarcadores cardíacos (troponina (TnI) e pro-péptido natriurético cerebral (*pro-BNP*)), factores de risco demográficos e cardiovasculares (idade, hipertensión, diabetes, hiperlipidemia, enfermidade hepática crónica e proteinuria) e factores de risco asociados ao estilo de vida, tales como hábito tabaqueiro ou obesidade<sup>6</sup>.



Figura 2. Factores a considerar na estratificación de risco en pacientes con tratamento antineoplásico potencialmente cardiotoxico. Adaptado de 6.

### 1.1.1 Epidemioloxía

A incidencia da CDTX varía substancialmente na literatura científica, isto débese fundamentalmente á variedade de esquemas quimioterápicos empregados, á heteroxeneidade dos factores de risco tidos en conta e ás distintas clasificacións da CDTX empregadas<sup>7</sup>. Dependendo do tratamento esta pode variar dun 0,2 a un 28%, e tendo en conta a dose acumulada en pacientes tratados con antraciclinas pode elevarse ata un 48%<sup>8</sup>. Datos recentes do rexistro CARDIOTOX, no que se fai un seguimento prospectivo durante 24 meses de pacientes con distinto tipo de cancro sometidos a tratamentos potencialmente cardiotoxicos, mostran datos obxectivos de lesión/disfunción miocárdica en preto dun 40% dos pacientes. Sen embargo, só un 0,7% desenvolven CDTX severa e un 2,4% insuficiencia cardíaca (IC)<sup>7</sup>.

### 1.1.2 Opcións terapéuticas fronte o cancro de mama

Existen distintas opcións terapéuticas fronte ao cancro de mama e a elección da mesma realízase de xeito individualizado en función de distintos factores, entre os que se pode destacar o subtipo tumoral, o estadio do tumor, o risco de recorrencia, a presenza de mutacións xerminais nos xenes 1 e 2 do cancro de mama (*BRCA1* e *BRCA2*), a idade dos pacientes, o estado de saúde xeral e as preferencias do mesmo. Se ben hai casos nos cales a enfermidade resólvese con terapia local, o

máis común é que se precise terapias neoadxuvantes e/ou adxuvantes co fin de diminuír o tamaño do tumor e/ou evitar unha recorrencia deslocalizada<sup>9</sup>.

A quimioterapia administrase en ciclos, xeralmente de 2-3 semanas de duración, os cales van seguidos de períodos de descanso con fin de minimizar os efectos secundarios. O plan varía segundo o esquema. Os mecanismos de CDTX varían entre os diversos quimioterápicos e os esquemas empregados. Os esquemas máis habituais no cancro de mama inclúen axentes citotóxicos tales como antraciclinas e taxanos, normalmente en combinación con axentes alquilantes<sup>10</sup>. En pacientes con cancro metastásico os axentes de elección son os antimetabolitos en combinación con antraciclinas. En etapas iniciais do cancro e en tumores que expresan o receptor do factor de crecemento epidérmico humano 2 (*HER2*) inclúense anticorpos monoclonais xunto coa terapia citotóxica<sup>11</sup>.

#### 1.1.2.1 Quimioterapia: mecanismos de CDTX.

As **antraciclinas** son derivados do antibiótico rodomicina B, illado de bacterias do xénero *Streptomyces* gram-positivas. Os mecanismos de acción non son totalmente coñecidos, pero se sabe que exerce a acción antitumoral mediante a indución de estrés oxidativo (produción de especies reactivas de osíxeno (EROs)), a estabilización da topoisomerasa II e a desregulación da homeostase do calcio, o que desencadea disfunción mitocondrial e consecuentemente apoptose celular. En consecuencia, un dos principais mecanismos de CDTX asociado as **antraciclinas** e o estrés oxidativo<sup>12</sup>, o acúmulo de EROs nos cardiomiocitos supera a súa capacidade antioxidante natural<sup>13</sup>, o cal desencadea disfunción mitocondrial, a activación das caspasas mitocondriais e finalmente a apoptose<sup>14</sup>. As antraciclinas únense á topoisomerasa II no cardiomiocito, causando a rotura do ADN, activando a apoptose mediante p53, o cal tamén contribúe a alterar as vías de bioxénese mitocondrial<sup>15</sup>. Por outra banda, as antraciclinas activan a vía do factor nuclear potenciador das cadeas lixeiras kappa das células B activadas (*NFκB*) a través do estrés oxidativo, incrementando aos mediadores da inflamación tales como interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6) e factor de necrose tumoral (*TNF*)<sup>12</sup>.

Finalmente, o tratamento con antraciclinas desencadea estrés de retículo endoplasmático (ERE), incrementando a expresión da proteína de unión a inmunoglobulina (*BiP*) e da proteína homóloga da proteína de unión al potenciador de CCAAT (*CHOP*) e desencadeando a apoptose do cardiomiocito<sup>16</sup> (Figura 3).

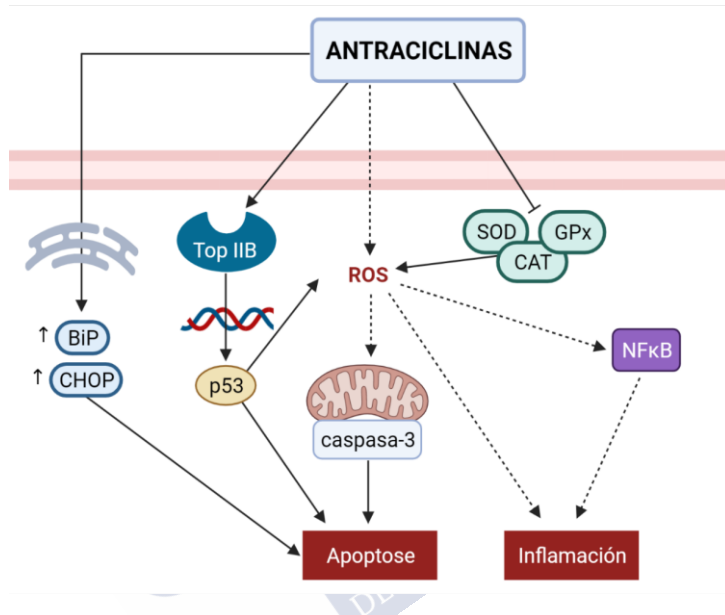


Figura 3. Mecanismos de CDTX activados por antraciclinas.  
Realizada en BioRender.com.

Todas estas alteracións moleculares desencadeadas polo uso de antraciclinas en esquemas de terapia anticanceríxena, poden desembocar en dano CV irreversible<sup>17</sup>. As complicacións CV secundarias ás antraciclinas poden aparecer de maneira aguda producindo dano no miócito, que no caso de manterse no tempo pode derivar en CDTX temperá ou tardía. A toxicidade aguda desencadea predominantemente arritmias supraventriculares que son normalmente reversibles<sup>8</sup>. Os efectos temperás ocorren no primeiro ano de tratamento, mentres que os máis tardíos demóranse unha media de 7 anos<sup>18</sup>. O dano miocárdico causado polas antraciclinas é dose-dependente, de tal xeito que a perda de funcionalidade progresa da

disfunción diastólica temperá cara unha disfunción sistólica e IC irreversible<sup>19</sup>.

Entre os **taxanos** atópase o paclitaxel, derivado da cortiza do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*)<sup>20</sup> e o docetaxel (DTX), procedente das raíces do teixo Europeo *Taxus baccata*. O paclitaxel úsase frecuentemente en combinación con antraciclinas en pacientes con cancro de mama metastásico ou que tiveron recidiva en menos de 6 meses despois da terapia adxuvante, mentres o docetaxel utilízase de xeito máis amplo contra diferentes tipos de cancro<sup>21</sup>. O mecanismo de acción dos taxanos basease na estabilización dos microtúbulos, impedindo a despolimerización do fuso mitótico durante a división celular. Ademais, foi descrito que o paclitaxel altera as correntes de potasio en células H9c2, o cal pode derivar en desordes na condutividade cardíaca<sup>22</sup>. Entre as complicacións CV derivadas da utilización dos taxanos son en maior parte alteración do ritmo como bradicardia e arritmias supraventriculares ou ventriculares, e isquemia miocárdica<sup>23</sup>. Ademais, os taxanos diminúen o aclarado das antraciclinas potenciando a súa CDTX<sup>24</sup>.

A nivel molecular os taxanos son capaces de activar varias vías de apoptose<sup>21,25</sup>. A toxicidade como consecuencia da estabilización dos microtúbulos polos **taxanos** asociase a alteracións nos procesos de transdución de sinais que participan da proliferación, expresión xénica ou apoptose<sup>26</sup>. Relacionouse a activación da caspasa-3 co docetaxel en células de cancro humanas<sup>27,28</sup>.

A **ciclofosfamida**, forma parte dos axentes alquilantes, sendo o máis utilizado no tratamento do cancro de mama<sup>9</sup>. Exerce o seu efecto antitumoral a través da alquilación do ADN, sendo capaz de metabolizarse a unha forma activa que inhibe a síntese de proteínas a través do entrecruzamento co ARN e o ADN<sup>29</sup>. A ciclofosfamida asóciase con pouca frecuencia coa CDTX<sup>10</sup>. Aínda con isto, foi descrito a nivel preclínico que pode estar implicado na inflamación do miocardio, a apoptose e o dano endotelial<sup>30</sup>. Os síntomas clínicos que poden aparecer en relación co uso da ciclofosfamida inclúen derrame pericárdico e miopericarditis, aparecendo dentro das dúas semanas dende o inicio do tratamento<sup>31</sup>. A ciclofosfamida pode tamén inducir



microembolias intracapilares que poden derivar na iniciación de dano isquémico no miocito<sup>23</sup>.

O **5-fluorouracilo**, un antimetabolito de orixe sintético, é un análogo da pirimidina uracilo, que se metaboliza pola mesma vía<sup>32</sup>. Foi utilizado durante moitos anos para o tratamento paliativo do cancro de mama metastásico, pero datos recentes demostran que administrado de maneira adxuvante en pacientes con cancro de mama residual, negativo para os receptores *HER2*, prolonga a supervivencia dos pacientes<sup>10,33</sup>. O 5-fluorouracilo exerce a súa actividade antitumoral por medio da inhibición da timidato sintasa e incorporando os seus metabolitos ao ARN e ADN<sup>34</sup>.

A manifestación clínica máis común de CDTX asociada 5-fluorouracilo e a dor no peito, o que suxire un evento isquémico, que pode variar dende una anxina ata un infarto agudo de miocardio<sup>35</sup>. Estudos experimentais revelan o potencial mecanismo das fluoropirimidinas, que vai dende a vasoconstrición endotelial mediada pola vía da proteína kinasa C ata o espasmo coronario por toxicidade endotelial mediada pola óxido nítrico sintasa<sup>36</sup>.

Entre os **anticorpos monoclonais** atópanse o trastuzumab e o pertuzumab, que se empregan de maneira habitual contra o cancro de mama *HER2* positivo. O trastuzumab foi o primeiro anticorpo monoclonal humanizado aprobado para os pacientes de cancro de mama<sup>37</sup>. Aínda que os mecanismos de acción non se coñecen totalmente, sábese que a unión do trastuzumab ao receptor *HER2* por unha banda inhibe a sinalización do *HER2* vía proteínas kinasas activadas por mitóxenos (*mitogen-activated protein kinases*, *MAPK*) e fosfatidilinositol 3 kinasa-*RACα* serina/treonina-proteína kinasa (*phosphatidylinositol 3-kinases-RACα serine/trreonine-protein kinase*, *PI3K-Akt*), suprimindo o crecemento e a proliferación celular e por outra determina súa internalización e ubiquitinización<sup>38</sup>. O pertuzumab é un anticorpo monoclonal dual que une *HER2* e *HER3*, prevendo a dimerización de ambos e suprimindo as vías *MAPK* e *PI3K-Akt* posteriores<sup>39</sup>.

Os mecanismos polos cales actúan os anticorpos monoclonales, en concreto o trastuzumab, pasan pola inhibición do receptor *HER2* no cardiomiocito, alterando vías de sinalización tales como *PI3K-Akt*,

*MAPK* e *Ras*, as cales participan en procesos esenciais como a proliferación, o crecemento e a supervivencia celular<sup>40</sup>. Ademais, estudos *in vitro* demostraron unha acción directa sobre a topoisomerasa II, potenciando desta maneira a CDTX asociada as antraciclinas<sup>41</sup>.

En canto ao pertuzumab, non afecta á cascada de sinalización de *HER2* en modelos *in vitro* en concordancia con estudos clínicos que describen que a adición do pertuzumab a terapias baseadas en trastuzumab non teñen efecto aditivo na CDTX<sup>42</sup>.

### 1.1.3 Radioterapia

A inclusión de sesións de radioterapia nos esquemas de tratamento han de terse en conta á hora de avaliar a CDTX. A radioterapia utilízase despois da cirurxía de conservación da mama e/ou da mastectomía, co obxectivo de reducir a recorrencia local por medio da eliminación de células tumorais residuais<sup>43,44</sup>. Cando o campo de irradiación inclúe o sistema cardiovascular o risco de CDTX aumenta de xeito significativo en función da presenza de factores de risco CV, a idade, as doses acumuladas altas ou fraccións de radiación de doses altas, o tempo de tratamento, a técnica de radiación, localización do tumor, radiación do tórax anterior ou esquerdo, e terapia concomitante con antraciclinas<sup>45,46</sup>. O maior reto diagnóstico na CDTX asociada a radioterapia e a demora no tempo de aparición, a miúdo décadas despois da exposición, polo que quedan enmascaradas debido a coincidencia de signos con outras enfermidades CV<sup>8,46</sup>.

Os mecanismos de dano por radiación son complexos e multifactoriais, entre os cales destacan unha resposta inflamatoria aguda no tecido irradiado e un incremento nas citokinas inflamatorias e factores de crecemento, as cales desencadean unha serie de respostas oxidativas que dan lugar a dano celular e tisular. Todas as estruturas cardíacas son susceptibles de sufrir dano por radiación, que poden agravarse polos tratamentos quimioterápicos. A enfermidade CV inducida por radiación inclúe enfermidades cardíacas, arteriosclerose prematura e acelerada, disfunción autónoma, enfermidades do pericardio e IC<sup>47</sup> (Figura 4).

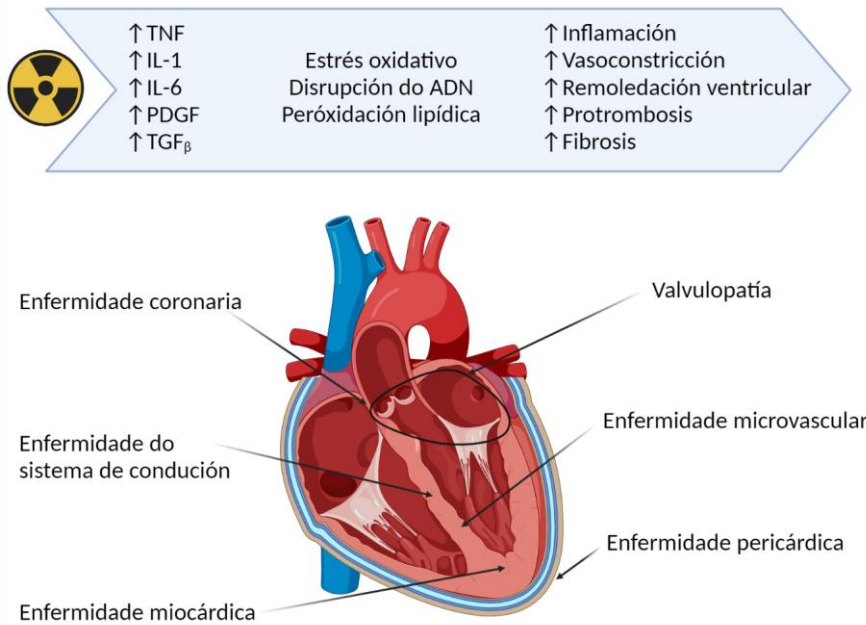


Figura 4. Dano cardíaco producido por radioterapia. Realizada en Biorender.com.

## 1.2 MANIFESTACIÓNS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DA CDTX

As complicacións CV máis preocupantes derivadas da terapia oncolóxica son a disfunción ventricular e a IC, o tempo no cal a CDTX se manifesta clínicamente varía segundo a terapia anticancerixena que estean recibindo os pacientes<sup>8</sup>. A disfunción do ventrículo esquerdo maniféstase como un descenso da fracción de exección (FEVE) do mesmo e nun 3-5% dos pacientes acaba por derivar en IC<sup>48,49</sup>. Outra das complicacións derivadas da terapia anticancerixena son as alteracións no ritmo e prolongación do intervalo QT electrocardiográfico, podendo derivar en arritmias ventriculares<sup>50</sup>.

### 1.2.1 Diagnóstico

En pacientes tratados con esquemas que inclúan quimioterápicos potencialmente cardiotóxicos, recoméndase a valoración funcional mediante ecocardiografía transtorácica, ventriculografía nuclear con

escáneres de adquisición múltiple cerrada (*multigated acquisition, MUGA*), ou resonancia magnética cardíaca<sup>51</sup>. Das tres, a ecocardiografía transtorácica é a técnica de imaxe máis frecuentemente utilizada para o diagnóstico de CDTX pola súa ampla dispoñibilidade, seguridade e baixo coste. Ademais da imaxe, a utilización de biomarcadores séricos na monitorización e diagnósticos supoñen unha oportunidade minimizar potenciais efectos adversos sobre o sistema CV (Figura 5).

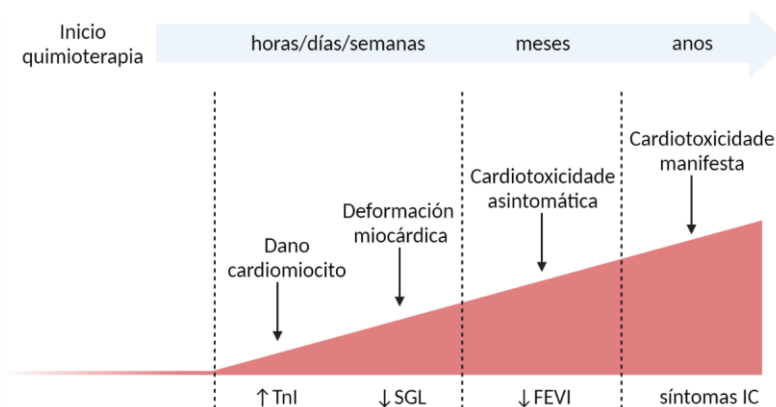


Figura 5. Progresión da CDTX segundo os biomarcadores. Adaptado de 72.

#### 1.2.1.1 Imaxe

O parámetro predominante para valorar a disfunción cardíaca é a diminución na contractilidade do ventrículo esquerdo, que se determina calculando a FEVE<sup>52</sup>. A FEVE expresa en porcentaxe, a cantidade de sangue que o corazón é capaz de bombear fora do ventrículo esquerdo durante a sístole<sup>53</sup> (Figura 6).

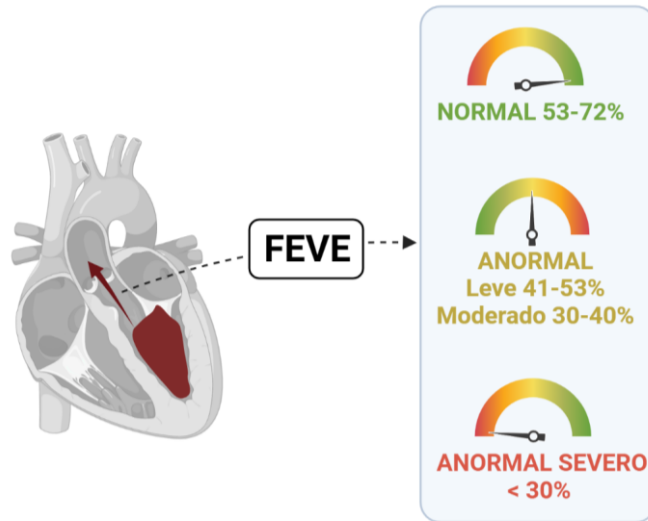


Figura 6. Rangos de disfunción CV definidos pola Asociación Americana de Ecocardiografía e pola Sociedade Europea de Imaxe Cardiovascular para a poboación feminina.

A clasificación da CDTX baseada na función cardíaca foi evolucionando en base a práctica clínica. Nun principio foi definida por distintas sociedades internacionais como unha caída na FEVE maior dun 10%, caendo por debaixo do 50%, ou maior dun 15% se a FEVE mantense por riba do 50%<sup>54</sup>. Máis tarde, nun documento de consenso da Sociedade Americana de Ecocardiografía e a Sociedade Europea de Imaxe Cardiovascular estableceuse como criterio de CDTX unha diminución da FEVE maior do 10%, cunha FEVE final por debaixo do 53%<sup>51</sup>. Recentemente, o rexistro CARDIOTOX<sup>7</sup> estableceu unha nova gradación do dano/disfunción cardíaca inducido por quimioterapia estratificando segundo a combinación de parámetros ecocardiográficos, biomarcadores e a presenza ou non de síntomas de IC (

Táboa 1).



Táboa 1. Gradación da CDTX segundo o rexistro CARDIOTOX<sup>7</sup>.

Normal	Biomarcadores e parámetros de función ventricular normais
Leve	Pacientes asintomáticos con <b>FEVE <math>\geq 50\%</math></b> e <b>biomarcadores elevados</b> ou polo menos un parámetro ecocardiográfico anormal: <ul style="list-style-type: none"> <li>• descenso da FEVE dun 10% por debaixo do 53%</li> <li>• SGL maior de 18%</li> <li>• redución relativa do SGL por riba do 15% con respecto ao basal</li> </ul>
Moderada	Pacientes asintomáticos cunha <b>FEVE <math>\geq 40\%</math></b> ou <b><math>&lt; 50\%</math></b> con ou sen elevación de biomarcadores ou outras anormalidades na función do ventrículo esquerdo
Severa	Pacientes con <b>FEVE asintomática <math>&lt; 40\%</math></b> ou <b>IC clínica</b>

A desvantaxe da utilización da FEVE como parámetro a medir na monitorización en pacientes que están a recibir tratamento quimioterápico é que no momento no cal se detecta alteración pode ser demasiado tarde para a intervención, dado que se xa se está a producir dano no miócito<sup>55</sup>. Está descrito que un 36% dos pacientes nos que se detectou un descenso da FEVE un mes despois de rematar o tratamento con antraciclinas non responden a tratamento para a IC<sup>56</sup>.

Semella importante polo tanto a detección de CDTX subclínica antes de que se evidencien cambios na FEVE, que indica que xa se está a producir deterioro funcional do ventrículo esquerdo. A detección precoz da CDTX e o seu tratamento é entón clave para evitar patoloxías máis severas.

O desenvolvemento recente de novas técnicas ecocardiográficas como o *strain* global lonxitudinal (SGL) por ecocardiografía bidimensional *speckle-tracking* mellorou notablemente a capacidade de avaliar a funcionalidade cardíaca. O *strain* é a valoración cuantitativa da deformación miocárdica durante a contracción, medindo o acurtamento muscular do ventrículo en dimensións lonxitudinais e circunferenciais (*strain* negativo) e o espesamento e alargamento en dirección radial (*strain* positivo)<sup>57</sup>. Estes vectores son o resultado da orientación das miofibras que xeran un xiro apical en sentido antihorario e un xiro basal en sentido horario, impulsando unha torsión na contracción ventricular<sup>58</sup> (Figura 7). O SGL expresa o acurtamento lonxitudinal como unha porcentaxe, con respecto á lonxitude basal<sup>59</sup>.

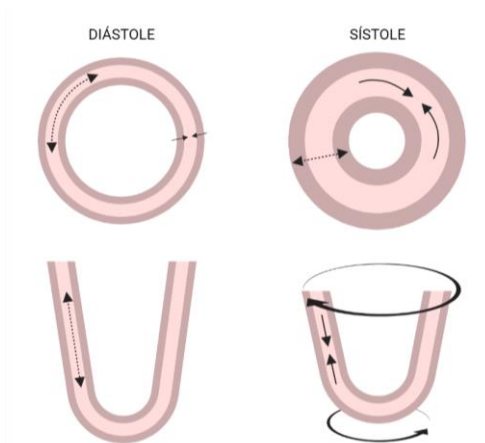


Figura 7. Representación esquemática da deformación miocárdica durante a contracción. Realizada en BioRender.com.

A implementación desta técnica no estudo prospectivo da CDTX puxo de manifesto que a capacidade de deformación do ventrículo esquerdo se altera de xeito subclínico de maneira previa á diminución da FEVE<sup>60</sup>. O feito de que o SGL se atope alterado de maneira previa á FEVE pode vir explicado porque na CDTX temperá a función dalgúns segmentos do miocardio poden estar compensando a disfunción doutros, exhibindo unha FEVE preservada<sup>61</sup>.

Sawaya e col. estableceron que, en pacientes diagnosticados con cancro de mama HER2 positivo e tratados con antraciclinas e trastuzumab, unha caída do 10% no terceiro mes de seguimento permite predicir disfunción ventricular, que neste caso se presentou no mes 6<sup>61</sup>. Outro estudo estableceu un punto de corte para a variación do SGL, afirmando que unha variación por riba do 14% a partir do terceiro mes de tratamento con antraciclinas e/ou trastuzumab en pacientes con cancro de mama era predictor independente de CDTX<sup>62</sup>. No ensaio SUCCOUR<sup>63</sup> publicado recentemente, definen a CDTX subclínica como unha redución relativa do SGL por riba do 12% ao longo do tratamento quimioterápico comparado cos niveis basais<sup>64</sup>. Previamente, os autores do SUCCOUR, estableceron uns valores límite para a monitorización da CDTX, afirmando que unha variación relativa por



riba do 15% con respecto a valores basais é significativa clinicamente, e que unha variación relativa por debaixo do 8% non ten importancia clínica<sup>60,65</sup>.

A pesar dos potentes resultados dos estudos realizados en base á utilidade clínica do SGL, este leva consigo unha serie de limitacións inherentes á técnica. Os valores do SGL dependen en grande medida da posición de medida do miocardio, do provedor e da versión do *software* para a análise<sup>51</sup>. Ademais, para a obtención de resultados robustos e fiables, é importante que se realice a medida do SGL en laboratorios de imaxe especializados monitorizando a calidade, e é precisa unha adecuada curva de aprendizaxe<sup>66</sup>.

#### 1.2.1.2 Marcadores séricos

Os biomarcadores mellor establecidos de dano cardíaco e disfunción ventricular son a TnI e o péptido *BNP*. Aínda que distintos traballos suxiren o seu uso<sup>67</sup> na identificación precoz e monitorización da CDTX, a súa utilidade segue sendo controvertido<sup>68-70</sup>.

As **troponinas cardíacas** son proteínas estruturais implicadas na contracción mediada por calcio, longamente empregadas como biomarcador de dano miocárdico<sup>71</sup>, incorporadas á valoración da CDTX asociada o tratamento contra o cancro. Numerosos estudos demostraron a relación da elevación da TnI co dano cardíaco inducido por antraciclina<sup>72</sup>. O incremento agudo dos niveis de TnI tralo tratamento con antraciclina a altas doses asociase cunha maior caída da FEVE e unha maior duración da mesma<sup>73</sup>. O incremento de TnI en pacientes con cancro de mama tratadas con trastuzumab asociase a unha menor recuperación da disfunción do ventrículo esquerdo e maior incidencia en eventos cardíacos<sup>74</sup>. Pola contra, hai estudos que non atopan correlación co grao de disfunción ventricular<sup>75,76</sup> e conceden escaso valor os niveis de TnI no seguimento temperá da toxicidade cardíaca<sup>77</sup>. Por outra banda, hai estudos que establecen valor predictivo no incremento da TnI de alta sensibilidade (hs-TnI) durante o tratamento<sup>78</sup>, ou en combinación co SGL<sup>79</sup>. Aínda que, en función do estudo, a elevación da TnI semelle predicir a disfunción do ventrículo esquerdo<sup>73</sup>, o incremento prodúcese ante un dano miocárdico, que se

ben pode ser asintomático e un dano establecido<sup>80</sup>, polo que non serve como predictor.

Os **péptidos natriuréticos** teñen como principal función o mantemento da homeostase cardiovascular, actuando sobre a vasodilatación, natriurese, inhibición do eixo renina-anxiotensina-aldosterona e inhibición do ton simpático<sup>72</sup>. En resposta á sobrecarga de volume ou estrés nos ventrículos, son liberados o *BNP* e o seu fragmento N-amino terminal (*NT-proBNP*)<sup>81</sup>. Na práctica clínica, os péptidos natriuréticos son amplamente utilizados no diagnóstico e pronóstico da IC<sup>82</sup>. Dado o seu valor como indicador da disfunción ventricular distintos traballos buscaron establecer a súa utilidade na predición temperá da CDTX. O incremento de *NT-proBNP* asóciase co desenvolvemento de disfunción diastólica en pacientes tratados con antraciclinas<sup>83</sup>. O incremento de *NT-proBNP* prodúcese antes de que se evidencien cambios na FEVE, suxerindo o seu valor como biomarcador temperán<sup>84,85</sup>. Non obstante, algúns estudos manteñen que *BNP* e *NT-proBNP* non teñen correlación coa CDTX inducida pola quimioterapia<sup>78,86</sup>. As posibles razóns desta controversia poden ser que as concentracións de *BNP* e *NT-proBNP* tamén se ven afectadas polo xénero, a idade e a función renal, o propio estado inflamatorio asociado o cancro<sup>87</sup> e os valores de referencia utilizados nos distintos estudos<sup>68</sup>.

Unha das limitacións descritas para a utilización dos péptidos natriuréticos no diagnóstico ou predición da CDTX é que estes poden atoparse elevados en inflamación asociada ao cancro, ou en aqueles pacientes con implicación metastásica<sup>87</sup>.

Existen outros biomarcadores que están sendo materia de estudo sobre os que existen menos datos. O incremento dos niveis de mieloperoxidasa, liberado polos neutrófilos en situacións de estrés oxidativo e inflamación, en pacientes con cancro de mama tratados con antraciclinas e trastuzumab asóciase a un maior risco dun evento cardiotóxico durante o período de tratamento, en concordancia co aumento da TnI<sup>88</sup>. Outros biomarcadores de fibrose, tales como a galectina-3 (Gal-3) e tipo 1 do receptor de interleukina-1 (ST2), e o factor de diferenciación do crecemento-15 (*GDF-15*), un membro dos factores de crecemento tumoral  $\beta$  (*TGF\beta*), son tamén potenciais

candidatos para o estudo da CDTX, aínda que ata o de agora non se obtiveron resultados concluintes<sup>89</sup>.

Na busca de novos biomarcadores de CDTX cada vez mais estudos sinalan o papel prometedor dos microARNs. Estudos *in vitro* demostraron incremento dose-dependente da expresión de mir-34a en cardiomiocitos tratados con antraciclinas<sup>90</sup>. Estudos en pacientes demostraron un incremento dose-dependente dos niveis circulantes de mir-29b e mir-499, sendo maior en pacientes con lesión miocárdica<sup>91</sup>. Por outra banda en pacientes con cancro de mama tratados con antraciclinas o incremento de mir-1 mostra unha maior sensibilidade de cara a discriminar entre pacientes que desenvolven ou non CDTX, ademais de correlacionar negativamente coa FEVE<sup>92</sup>.

Entre os novos biomarcadores de CDTX, os máis prometedores semellan ser os microARNs circulantes ou microARNs das células mononucleares de sangue periférica (PBMCs) que serán pormenorizados máis en adiante.

### **1.2.2 Estratexias de prevención e tratamento**

As estratexias de prevención e tratamento pasan por unha adecuada estratificación do risco CV no paciente con cancro e unha avaliación continua dos factores de risco tradicionais e os propios do proceso oncolóxico, co fin de establecer os obxectivos de control, iniciar estratexias de prevención dirixidas e planificar a monitorización ao longo do tratamento<sup>6</sup>.

Ningún modelo recolle de forma específica o cancro e a terapia oncolóxica como factores de risco CV, o que leva implícito unha clara subestimación dos mesmos no paciente oncolóxico. Datos recentes, mostran a utilidade clínica da escala SCORE (*Systemic Coronary Risk Estimation*), que inclúe idade, sexo, tabaquismo, colesterol e presión arterial sistólica na predición de CDTX grave e mortalidade por calquera causa a 2 anos de seguimento<sup>5,45</sup>. En relación cos factores de risco propios de enfermidade CV, hai que ter en conta a os antecedentes de enfermidade CV, tanto do individuo como os antecedentes familiares, as enfermidades do sistema inmune, diabetes mellitus (DM) de longa evolución, insuficiencia renal crónica, elevación extrema da lipoproteínas ou arteriosclerose subclínica á hora de establecer o risco

CV. Ademais, é preciso ter en conta distintos factores modificadores do risco CV, específicos do proceso oncolóxico. O risco de morte CV incrementa de 2 a 7 veces nos pacientes con antecedentes de cancro, pode incluso superar a mortalidade asociada ao proceso oncolóxico nos cancros con maior supervivencia<sup>93</sup>. Se ben, determinados procesos oncolóxicos en si, son preditores independentes de enfermidade CV, as estratexias de prevención da CDTX pasan necesariamente polo control dos factores de risco CV e os asociados o tratamento do cancro<sup>45</sup>.

#### 1.2.2.1 Factores de risco CV

A adopción de estilos de vida saudable e unha das principais estratexias de prevención da CDTX. A adopción de dietas saudables, como a dieta mediterránea, baixa en graxas saturadas e azucres refinados, a supresión de hábitos tóxicos como o tabaquismo e a redución do consumo de alcohol teñen demostrado un claro beneficio no control do sobrepeso, no control glucémico e da hipertensión arterial (HTA) o que ademais de reducir o risco de enfermidades CV, evita a interrupción de tratamentos eficaces.

Especial mención require a actividade física no control do risco cardiovascular en pacientes con cancro. Cada vez mais estudos evidencian os beneficios dos programas de exercicio na calidade de vida do paciente oncolóxico<sup>94-96</sup>. A melloría da función cardiopulmonar asociada a programas de actividade física podería prever os efectos negativos da quimioterapia en pacientes de cancro de mama<sup>97,98</sup>. Un estudo levado a cabo con pacientes con cancro de mama mostrou unha redución do 23% no risco a desenvolver de eventos CV naquelas pacientes que seguiron as recomendacións de actividade física semanal<sup>99</sup>. Un estudo cun modelo murino sometido a tratamento con doxorubicina (DOX) mostrou que o exercicio físico protexe ás mitocondrias do estrés oxidativo<sup>100</sup>.

#### 1.2.2.2 Dano por radioterapia

Cando o campo de irradiación inclúe estruturas cardiovasculares o risco de enfermidade CV aumenta de forma significativa. Neste senso, estratexias mecánicas como a irradiación en decúbito prono a glándula mamaria, o que permite separar o máximo o

campo das estruturas cardíacas<sup>101</sup> ou tecnolóxicas como a planificación da pre-radioterapia 3D, na que mediante tomografía computerizada determináanse os volumes obxectivo e os órganos risco nun modelo 3D, evitando ao máximo irradiar tecidos sáns<sup>47</sup> reducen significativamente o risco de toxicidade. Por outra banda a radioterapia intraoperatoria, que consiste en irradiar cunha sola fracción a leito da tumorectomía durante a cirurxía, reduce considerablemente os volumes de radiación e o risco de CDTX<sup>102</sup>.

### 1.2.2.3 Dano por quimioterapia

Fronte o dano inducido polo tratamento oncolóxico, en pacientes con enfermidade CV previa ou en pacientes que presenten alteracións suxestivas de CDTX durante o tratamento, recoméndase o uso de estratexias de cardioprotección, que ben pasan pola adaptación do esquema quimioterápico ou polo uso fármacos cardiovasculares. En relación coa modificación da terapia contra o cancro, o uso de formulas liposomais<sup>103–105</sup> ou o uso de dexrazoxano<sup>106,107</sup> mostraron unha redución significativa do risco de disfunción ventricular.

No uso de fármacos CV nas estratexias de cardioprotección cabe destacar, polo número de estudos levados a cabo, os  $\beta$ -bloqueantes, os inhibidores da enzima convertedora de angiotensina (IECAs) e os antagonistas dos receptores de angiotensina II (ARAIIs)<sup>108</sup>.

En xeral os estudos relativos a estratexias de cardioprotección, con IECAs/ARAII e  $\beta$ -bloqueantes en pacientes, de xeito individual ou en combinación, mostrou resultados equívocos posiblemente debido as diferenzas na definición obxectivo primario e secundario, o propio efecto sobre os factores de risco CV e a variabilidade metodolóxica no método de constatación, aspectos que limitan a comparación directa entre eles. En xeral, a pesar da variabilidade, hai evidencias inconsistentes de que o tratamento con IECAs/ARAII e  $\beta$ -bloqueantes proporciona unha cardioprotección substancial contra os descenso da FEVE<sup>109</sup>.

### 1.3 OUTROS FACTORES DE DETERMINAN CDTX

#### 1.3.1 Xenética

Os mecanismos que determinan unha maior ou menor susceptibilidade á CDTX son ata o de agora descoñecidos, sen embargo, considerase que esta vén definida pola interacción entre os fármacos e os xenes do paciente, o que se coñece como farmacoxenética.

As modificacións epixenéticas, tales como a metilación do ADN, as modificacións das histonas e a expresión de ARNs non codificantes, xogan un papel clave na etioloxía de distintas patoloxías CV<sup>110,111</sup>. Distintos estudos sinalan que as modificacións epixenéticas xogan un papel central na resposta os fármacos. En células H9c2, mostrouse como a DOX pode afectar á metilación global do ADN a través alteración da función mitocondrial<sup>112</sup>. Ademais, en modelos murinos observouse que os efectos deletorios da DOX veñen mediados por un aumento na expresión da histona desacetilasa no miocardio<sup>113</sup>, e que a súa inhibición farmacolóxica resulta exercer un efecto cardioprotector<sup>114</sup>.

##### 1.3.1.1 Bioxénese dos microARNs

Os microARNs son pequenos oligonucleótidos compostos por 18 a 25 bases, procedentes de rexións non codificantes<sup>115</sup>. Os microARNs regulan a expresión xénica a nivel post-transcripcional, uníndose e inhibindo ao ARNm<sup>116</sup>.

A bioxénese dos microARNs (Figura 8) comeza coa síntese por parte da ARN polimerasa II ou III do pri-microARN, un transcrito longo dunhas 100 pares de bases<sup>117</sup>. Seguidamente, o pri-microARN é procesado por un enzima nuclear con actividade ARNasa (DROSHA), a pre-microARN con 70 pares de bases que recoñece. Os pre-microARN son exportados ao citoplasma pola exportina 5. No citoplasma son recoñecidos pola unha ARNasa endonucleasa (DICER) que rompe o bucle terminal converténdoo nunha dobre cadea de ARN maduro de aproximadamente 22 pares de bases<sup>118</sup>. A direccionalidade do microARN determina o nome do microARN maduro. A selección da hebra 5p, procedente do brazo 5', ou da 3p, procedente do 3' baséase

na estabilidade termodinámica dos extremos 5' do dúplex de ARN. Aquela con menor estabilidade cargarase en proteínas da familia Argonauta (AGO2) e considérase a guía, mentres que a outra será xeralmente será degradada<sup>118</sup>. Seguidamente recrútanse proteínas AGO2 para formar o complexo silenciador inducido por ARN (*RNA-induced silencing complex, RISC*)<sup>119</sup>. Neste punto o microARN posúe a capacidade de unión ao ARNm, que dependendo da complementariedade de bases, completa ou incompleta, pode degradalo ou inhibir a súa tradución respectivamente<sup>115</sup>. Mediante este mecanismo un só microARN ten a capacidade de unirse a miles de ARNm, así como un ARNm pode ser diana de miles de microARNs<sup>116</sup>.

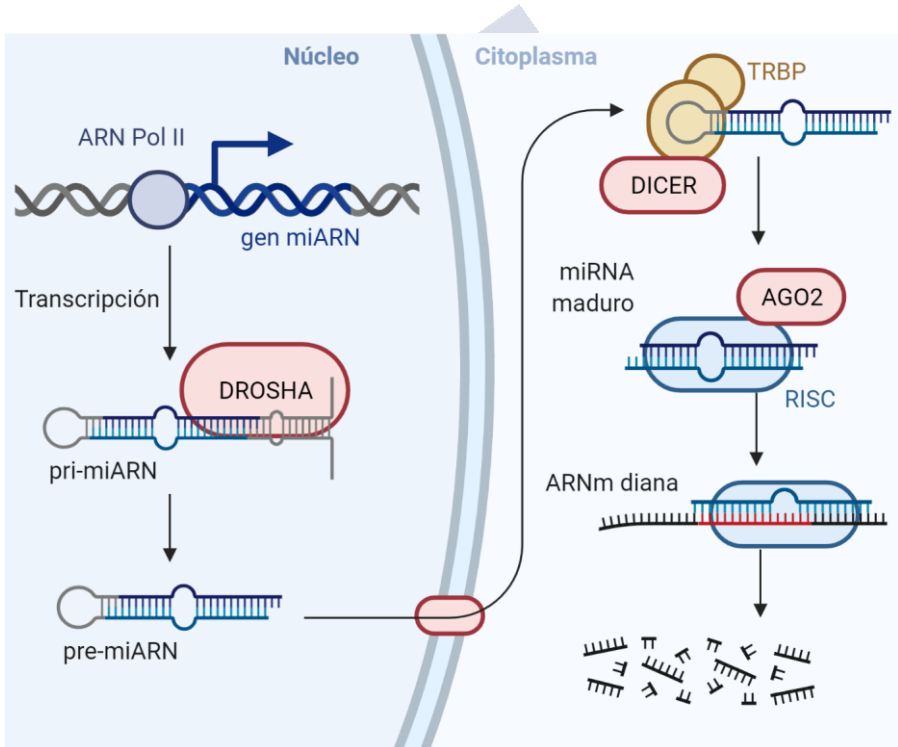


Figura 8. Esquema xeral da bióxénese dos microARNs. Realizada con BioRender.com.

### 1.3.1.2 microARNs circulantes

Os microARNs poden ser secretados ao medio extracelular como microvesículas ou exosomas, ou unidos a complexos proteicos como lipoproteínas ou Argonauta, baixo determinadas condicións tales como dano celular, inflamación ou apoptose<sup>120</sup>. Isto permite que poidan actuar como sinais entre diferentes células e tecidos<sup>121</sup> e lles confire unha elevada estabilidade a nivel circulante, evitando a acción das ribonucleasas.

Os cambios na expresión e nos niveis de microARNs extracelulares, en resposta a condicións fisiopatolóxicas ou tratamentos farmacolóxicos<sup>122</sup>, son detectables en distintos fluídos biolóxicos (soro ou plasma, urina, saliva, bágoas, etc). Ademais da importancia mecanística como reguladores epixenéticos, a estabilidade dos microARNs nos distintos fluídos permite o seu uso como potenciais biomarcadores prognósticos e diagnósticos<sup>123</sup>.

### 1.3.1.3 microARNs en *PBMCs*

Cada vez mais traballos subliñan o valor das *PBMCs* coma fonte de biomarcadores o mostrar cambios no perfil de mRNA/microRNAs e de metilación en resposta a distintas situacións fisiopatolóxicas<sup>124</sup> coma diferentes tipos de cancro, diabetes, trastornos do sistema nervioso e cardiovasculares<sup>125–127</sup>.

En relación a patoloxía cardiovascular, a expresión xénica nas *PBMCs* mostrase alterada en enfermidade arterial coronaria (EAC), a IC crónica (ICC) e a DM tipo 2<sup>128–130</sup>. Dado que o transcriptoma das células cardíacas circulantes coincide en mais dun 80% co tecido cardíaco<sup>131</sup>, o estar sometidas as mesmas circunstancias fisiopatolóxicas estas son capaces de reflexar o estado metabólico e transcriptómico das células cardíacas, de tal xeito que pode considerarse unha “biopsia subrogada” do tecido cardíaco<sup>132</sup>. A comunicación célula-célula dependente dos microARNs semella ser a mellor explicación para este fenómeno no que os microARNs circulantes secretados polos tecidos anormais poden levar a cambios na expresión xénica e no perfil de metilación de células receptoras<sup>133,134</sup>.



#### 1.3.1.4 Papel dos microARNs na patoloxía CV

Dado que a principal función dos microARNs é regular rutas metabólicas, a nivel CV toman relevancia clínica, xa que afectan a aquelas implicadas en enfermidades CV tales como o metabolismo lipídico e a homeostase da glucosa, ademais de ser reguladores clave en células vasculares e endoteliais<sup>135</sup>.

Distintos traballos sinalan a relación entre os cambios na expresión dos microARNs e a fisiopatoloxía da enfermidade CV. Cambios na expresión de microARNs tras un evento isquémico asóciase a procesos clave coma son o remodelado, apoptose e hipertrofia cardíaca<sup>136</sup>. Durante infarto de miocardio (IM), os microARNs son liberados ao sangue, resultando nun incremento na súa expresión a nivel circulante<sup>137,138</sup>. Nun modelo murino de IM atopouse relación temporal da expresión do mir-208 coas troponinas cardíacas<sup>139</sup>. A diminución da expresión de mir-29 na zona peri-infarto induce a sobreexpresión de coláxeno, fibrina e elastina<sup>140</sup>. Por outra banda, a inhibición de mir-15, regulado en procesos de isquemia e IC, protexe contra a apoptose de cardiomiocitos inducida por hipoxia/reoxixenación<sup>141</sup>. O mir-320 xoga tamén un papel clave no dano por isquemia/reperfusión (I/R) inducendo a vía apoptótica mitocontrial<sup>142</sup>. En pacientes e en modelos animais con hipertrofia cardíaca hai unha diminución dos niveis de expresión de mir-133 e mir-1. A sobreexpresión destes en modelos experimentais diminúe a resposta hipertrófica<sup>143</sup>. A IC tamén está asociada a hipertrofia e apoptose de cardiomiocitos e alteracións na expresión de xenes cardíacos a nivel celular<sup>144</sup>. Ademais, os niveis séricos de mir-423-5p, foron avaliados como biomarcador potencial no diagnóstico e pronóstico da IC<sup>145</sup>. Por outro lado os mir-1 e mir-133 xogan un papel importante na fisiopatoloxía de arritmias, regulando a expresión de xenes clave nos canles de potasio<sup>146,147</sup>.

Estes resultados poñen de manifesto a importancia da identificación de microARNs en patoloxías CV e a súa potencial aplicación clínica.

### 1.3.1.5 Papel dos microARNs na CDTX

A maior parte de datos, *in vitro* e *in vivo*, proceden de en estudos de CDTX inducida polas antraciclina<sup>148</sup>. Ratas tratadas con DOX mostraron un aumento significativo nos niveis plasmáticos de mir-1, mir-133a e mir-208<sup>149</sup>. Ademais, atopáronse niveis plasmáticos máis elevados de miR-34a e miR-122 en 25 pacientes con cancro de mama que recibían quimioterapia baseada en antraciclina despois do tratamento<sup>150</sup>. Os estudos realizados en pacientes mostran resultados discordantes en relación aos perfís de expresión de microARNs, o que dificulta a identificación de candidatos para a avaliación da CDTX<sup>151</sup>. Ademais, tamén se observa unha heteroxeneidade significativa en diferentes estudos relacionados cos criterios de CDTX, o número de pacientes incluídos e o número de microARNs investigados<sup>152</sup>. Pereira e col. atoparon que let-7f, mir-1, mir-20a, mir-126 e mir-210 teñen a súa expresión significativamente alterada en dúas cohortes de pacientes con cancro de mama con CDTX inducida por antraciclina<sup>153</sup>. Aínda que estes estudos previos demostraron que os microARNs representan biomarcadores potenciais para enfermidades cardíacas, son necesarias máis investigacións para coñecer a posible implicación dos microARN na CDTX inducida por antraciclina<sup>80</sup>. A pesar da importancia clínica, moitos dos estudos centráronse no uso de modelos animais preclínicos, que teñen limitacións como preditores da bioloxía humana<sup>154</sup>.

### 1.3.2 Perfil metabólico

O cancro e a enfermidade CV son na actualidade as dúas principais causas de morte a nivel mundial. Aínda que historicamente foron consideradas coma dúas entidades totalmente independentes, a presenza de características e de factores de risco en común suxiren unha bioloxía compartida. Unha análise de seguimento do estudo Framingham establece á obesidade como un factor de risco independente para desenvolver IC, EAC, accidente cerebrovascular e morte por enfermidade CV xeral, así coma unha maior prevalencia de comorbilidades coma DM, HTA e síndrome metabólico, o que finalmente aumenta o risco de enfermidade CV<sup>155</sup>. Fronte a cantidade de estudos sobre relación patoloxía CV-obesidade, a relación desta última co cancro foi menos estudada e a súa relación é mais

controvertida<sup>156</sup>. Por unha banda a obesidade foi identificada coma o segundo factor de risco de cancro en fumadores, o primeiro en non fumadores<sup>157</sup>. Así mesmo, asociase cun menor tempo de recorrencia e aumento da mortalidade debida ao cancro<sup>158,159</sup>. Aínda que os mecanismos moleculares que relacionan a obesidade co risco/prognose do cancro non son de todo coñecidos, a obesidade crea un medio hospedador caracterizado por unha inflamación sistémica de baixo grado, alteración da sinalización dos esteroides sexuais e incremento da insulina/factores de crecemento que poden provocar proliferación celular e progresión malignas. Por outra banda, hai estudos que exclúen a obesidade como factor de risco e outros que afirman que diminúe a incidencia de determinados tipos de cancro<sup>156</sup>.

Ademais de no risco e no pronóstico do cancro, hai estudos que demostran unha clara relación entre a obesidade e a CDTX asociada ao tratamento do cancro<sup>160</sup>. As causas desta asociación non están totalmente claras. Por unha banda están as cuestións individuais coma e a xenética<sup>161</sup> ou o propio axuste do tratamento en función do peso<sup>162</sup>, que poderían explicar a co-ocorrencia de ambas entidades e a maior susceptibilidade a toxicidade, independentemente dos factores de risco do estilo de vida<sup>163</sup>. Por outra banda están os aspectos funcionais, coma unha maior vida media das antraciclinas en sangue, debido o cambios das propiedades farmacocinéticas<sup>164</sup> e os aspectos fisiopatolóxicos, que levan consigo un aumento do estres oxidativo, desregulación do metabolismo enerxético, a dilatación ventricular e a alteración da función sistólica<sup>165,166</sup>. En modelos de sobrepeso por sobrealimentación neonatal demostrouse a aparición de CDTX a doses máis baixas de antraciclinas que en animais con normopeso, o que suxire unha maior susceptibilidade aos efectos cardiotóxicos<sup>98</sup>. En modelos murinos de obesidade observouse unha maior susceptibilidade á disfunción sistólica e alteración da función mitocondrial en cardiomiocitos<sup>165,166</sup>.

O feito de que en pacientes con cancro de mama e obesidade a aparición de CDTX sexa independente do tratamento<sup>167</sup>, inclina o punto de mira cara a propia obesidade, sen embargo, a heteroxeneidade observada na relación obesidade-cancro, na que certos estudos suxiren que un exceso de adiposidade pode ser incluso beneficiosa<sup>156</sup>, pon o punto de mira na calidade ou funcionalidade do tecido adiposo e non no

grado de adiposidade. Fronte a perspectiva clásica de tecido adiposo coma un reservorio pasivo de enerxía, o tecido adiposo está recoñecido como un órgano capaz de sintetizar e secretar unha variedade de péptidos bioactivos coñecidos como adipokinas, que actúan como mediadores autocrinos/paracrinos/endocrinos, e que polo tanto a súa desregulación pode xogar un papel deleterio na fisioloxía CV<sup>168</sup>.

Deste xeito, o incremento da morbi-mortalidade asociada a obesidade é principalmente atribuíble a un tecido adiposo disfuncional<sup>169</sup>. Datos recentes en pacientes asintomáticos suxiren que as anomalías metabólicas, e non a obesidade, son en si o verdadeiro factor de risco para a progresión do cancro<sup>170</sup> e un mecanismo potencial na relación entre obesidade e CDTX<sup>171,172</sup>. No contexto de sobrepeso/obesidade e cancro, por una banda, a hipertrofia do tecido adiposo conleva un contexto inflamatorio que altera a actividade metabólica do adipocito, incrementando a produción e secreción de adipoquinas<sup>169</sup>, e por outra banda as células tumorais son capaces de mudar o fenotipo dos adipocitos, favorecendo a lipólise e modulando a expresión de citokinas proinflamatorias, que a súa vez incrementan a agresividade do tumor<sup>173</sup>.

Os devanditos cambios na función endocrina do tecido adiposo xogan un papel crucial no incremento da susceptibilidade a desenvolver CDTX<sup>171,172</sup>. Neste contexto resulta interesante caracterizar a regulación de adipokinas implicadas en procesos clave no desenvolvemento de CDTX como son a regulación da fibrose, o remodelado cardíaco e disfunción ventricular, e a súa relación cos parámetros de CDTX.

A **omentina** (OMT), tamén coñecida como intelectina-1, é unha adipokina expresada e secretada fundamentalmente polo tecido adiposo visceral<sup>174</sup>. A OMT exerce un efecto positivo na sinalización da insulina e na inflamación<sup>175</sup>. En individuos con obesidade, a expresión de OMT no tecido adiposo visceral e os niveis circulantes, diminúen, correlacionándose positivamente con niveis de adiponectina (AdipoQ) plasmática e lipoproteínas de alta densidade (*HDL*) e negativamente cos niveis de leptina e insulina<sup>174</sup>. A nivel CV, baixos niveis de OMT están asociados a enfermidade coronaria, IC, infarto agudo de miocardio e enfermidade isquémica<sup>176-181</sup>. O papel que xoga a OMT nestas

patoloxías é a día de hoxe incerto. En pacientes infartados, os niveis de OMT incrementan os 6 meses, correlacionando negativamente cos niveis de proteína C reactiva (P.C.R.) e interleukina 18 (IL-18) o que suxire un papel na supresión da inflamación<sup>182</sup>. Estudos en modelos animais de dano por I/R, a administración de OMT logrou diminuír o tamaño do infarto e a apoptose mediante a activación de *AMPK* e *Akt*<sup>183</sup>. Por outra banda, a activación da proteína kinasa activada por adenosina monofosfato (*AMPK*) trala administración ou sobreexpresión de OMT diminúe a hipertrofia e a resposta fibrótica en modelos murinos de constricción aórtica<sup>184</sup>.

En relación coa CDTX, demostrouse que os niveis de expresión xénica e os niveis circulantes de OMT en pacientes con cancro de mama son máis baixos que a poboación xeral<sup>185</sup> e que estes teñen valor pronóstico. Tendo en conta o papel da OMT na fisioloxía CV, estes datos suxiren unha maior susceptibilidade os efectos deletorios da terapia oncolóxica. Neste sentido, estudos recentes *in vitro* mostran como a apoptose de cardiomiocitos inducida por antraciclinas é contrarrestada pola OMT vía a inhibición de estrés oxidativo<sup>172</sup>. Isto suxire que niveis alterados de OMT poden contribuír a CDTX inducida por quimioterapia.

Ao igual que a OMT, a **adiponectina** (AdipoQ) está considerada unha adipokina antiinflamatoria. Esta modula os niveis de marcadores proinflamatorios e estrés oxidativo<sup>186</sup>. Os niveis circulantes de AdipoQ, diminuídos en pacientes con obesidade, relaciónanse con disfunción endotelial, enfermidade de arteria coronaria (EAC) e inflamación valvular<sup>168</sup>. En relación o cancro, a AdipoQ é recoñecida como un axente anticanceríxeno no cancro de mama. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostran una diminución da expresión de AdipoQ en adipocitos asociados a células tumorais. Distintos estudos epidemiolóxicos asociaron baixos niveis circulantes de AdipoQ, independentemente do índice de masa corporal (IMC), cun aumento do risco de cancro de mama e un fenotipo máis agresivo<sup>187</sup>. A AdipoQ é expresada e segregada polos cardiomiocitos humanos, onde aumenta a captación de glicosa e ácidos graxos, o que suxire un papel da mesma na regulación do metabolismo e na función cardíaca<sup>188</sup>. Nun modelo murino de CDTX inducida por doxorrubicina a AdipoQ presentou evidencias de reducir

a apoptose e a IC por medio da activación de *AMPK*<sup>189</sup>. Por outra banda o uso de agonistas da AdipoQ consegue inhibir a inflamación, a fibrose cardíaca, a apoptose e o estrés oxidativo inducida en ratos sometidas a tratamento con *DOX*<sup>190</sup>, suxerindo potencial papel cardioprotector desta adipokina fronte a CDTX inducida por quimioterapia.

A **Gal-3** é un biomarcador circulante relacionado coa inflamación e a fibrosis, directamente relacionada coa remodelación cardíaca adversa<sup>191</sup>. A Gal-3 exprésase en varios tipos celulares e tecidos, como macrófagos activados, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, epitelio das vías gastrointestinais e respiratorias, riles e algunhas neuronas sensoriais, e tamén está implicado na tumorixenesis, anxioxénese e metástase tumoral<sup>192</sup>. A expresión de Gal-3 correlacionouse cunha serie de tumores malignos entre eles o cancro de mama<sup>193</sup>. Aínda que se expresa no miocardio en condicións normais, estableceuse o papel patoxenético da Gal-3 en diferentes enfermidades CV como hipertensión, enfermidade arterial coronaria/infarto de miocardio, fibrilación auricular e IC<sup>194</sup>.

En relación coa CDTX e, estudos *in vitro* e *in vivo* de células H9c2 e ratas tratadas con DOX mostraron que a CDTX inducida por DOX está mediada por Gal-3 e que a inhibición de Gal-3 atenuou a disfunción cardíaca inducida por DOX reducindo o estrés oxidativo miocárdico<sup>195</sup>.

A **proteína de unión a ácidos graxos-4** (*FABP4*), tamén coñecida como aP2, é a isoforma específica da familia de proteínas que unen ácidos graxos e constitúe ao redor do 6% do total das proteínas de adipocitos. Tamén está presente en células dendríticas, macrófagos e no torrente sanguíneo despois da súa liberación por parte dos adipocitos. Como chaperona lipídica, a *FABP4* orchestra vías intracelulares que levan á activación inflamatoria, desenvolvemento de aterosclerose e resistencia á insulina<sup>196</sup>. En persoas con enfermidade coronaria coñecida, a *FABP4* asociouse a lesións coronarias complexas, hipertrofia do ventrículo esquerdo, disfunción sistólica, anomalías da perfusión miocárdica, IC clínica, e eventos adversos en pacientes con enfermidade coronaria estable, así como despois da síndrome coronaria aguda<sup>197</sup>. A *FABP4* circulante secretada polo tecido adiposo ou macrófagos é capaz de suprimir a contracción dos cardiomiocitos e regular directamente a función cardíaca<sup>196</sup>. A *FABP4* pode considerarse

como importante biomarcador do desenvolvemento do cancro de mama, mentres que a súa forte asociación coa obesidade indica que pode ser un obxectivo terapéutico clave para o tratamento do cancro de mama relacionado coa obesidade<sup>198</sup>. Está demostrada a expresión de *FABP4* nos tecidos cardíacos, ademais no desenvolvemento da miocardiopatía mediada por DOX, existe unha relación entre a exposición ao DOX e a sobreexpresión do xene *FABP4*. Non obstante, só comezan a xurdir os mecanismos moleculares subxacentes polos cales *FABP4* regula a función dos cardiomiocitos e a súa contribución á CDTX por DOX<sup>199</sup>.



# OBXECTIVOS







## 2 OBXECTIVOS

---

Tendo en conta o exposto ata agora, os obxectivos que se plantexan nesta tese son os seguintes:

1. Detección precoz da cardiotoxicidade nunha cohorte de pacientes con cancro de mama sometidas a tratamento quimioterápico.
2. Caracterización dos microARNs como novos biomarcadores de cardiotoxicidade subclínica.
3. Análise *in silico* das rutas moduladas polos microARNs diferencialmente expresados na cardiotoxicidade subclínica.
4. Caracterización dos niveis de adipokinas implicadas na función cardiovascular como novos biomarcadores de cardiotoxicidade subclínica.
5. Avaliación *in vitro* do papel cardioprotector da omentina fronte á toxicidade inducida polo docetaxel.



# MATERIAIS E MÉTODOS





## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1 ESTUDOS CLÍNICOS

#### 3.1.1 Criterios de inclusión e exclusión

Trátase dun estudo prospectivo no que se incluíron de forma consecutiva, entre setembro do 2014 e xuño do 2018, pacientes diagnosticados de cancro de mama recrutados dende o Servizo de Oncoloxía e Cardiología do CHUS, cunha esperanza de vida superior aos 6 meses e con indicación de esquemas de tratamento que inclúan quimioterápicos asociados con risco CV. En calquera caso, a prescrición de medicamentos antineoplásicos foi independente da inclusión de pacientes no estudo. Para as análises, foron excluídos do estudo aqueles pacientes con antecedentes de cancro previo, mala ventá ecocardiográfica, homes e aqueles que se desvían do protocolo ou retiran consentimento.

#### 3.1.2 Datos clínicos e recollida de mostras

No momento da inclusión ao estudo, previo ao tratamento quimioterápico realizouse a determinación de parámetros ecocardiográficos (indicados a continuación) polo persoal asistencial do servizo de cardiología do CHUS, e tomouse unha mostra de sangue para a determinación dos parámetros séricos (indicados a continuación) polo servizo de análises clínicas do CHUS. A toma de mostras para a determinación do perfil de microARNs e adipokinas e illamento de células mononucleares de sangue periférico ou *PBMCs* realizouse por parte do persoal do hospital de día da área de oncoloxía do CHUS. Os tempos de recollida de mostras, datos ecocardiográficos e datos clínicos, ademais de no momento previo ao tratamento, foron ás 3 semanas, 3, 6 e 12 meses durante o tratamento quimioterápico (Figura 9).

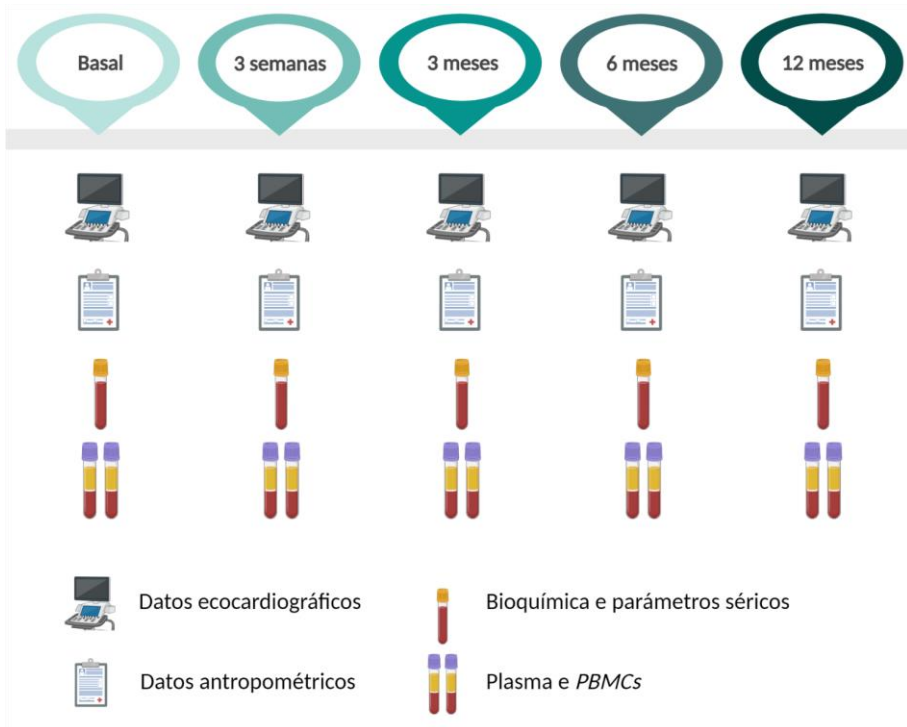


Figura 9. Cronoloxía do esquema de recollida de mostras e estudo ecocardiográfico. Creada en BioRender.com

### 3.1.2.1 Datos clínicos

Recolléronse os seguintes datos clínico dos pacientes:

- Datos xerais dos pacientes: data de nacemento, xénero, idade ao inicio do estudo, altura, peso, IMC.
- Factores de risco CV: enfermidade CV previa, hábito tabaqueiro, HTA, DM e dislipemia.
- Datos ecocardiográficos: FEVE e SGL do ventrículo esquerdo.
- Datos da bioquímica e marcadores séricos: creatinina, filtrado glomerular, glucemia, hemoglobina e HbA1c, colesterol total e LDL, HDL e TG, pro-BNP, TnI e hs-TnI e P.C.R.

- Tipo de cancro e subtipo: ductal, intraductal, micropapilar ou lobullilar; luminal A/B, Her2 ou triple negativo; e presenza de receptores de estróxeno ou de proxesterona.
- Tratamento quimioterápico: doses acumuladas de taxanos, antraciclina, anticorpos monoclonais, axentes alquilantes e antimetabolitos e doses acumuladas.
- Tratamento CV: beta-bloqueantes, iECAs, ARAiIs e estatinas.

A recollida de datos e de mostras para a elaboración deste traballo foron aprobadas polo Comité Ético da Xunta de Galicia, con número de rexistro 2014/362, cumprindo coas especificacións da declaración de Helsinki (Anexo).

### 3.1.3 Poboación de estudo

As pacientes clasificáronse en base á presenza de CDTX subclínica tendo en conta os parámetros ecocardiográficos (variación ou non da FEVE e/ou do SGL (Figura 10). Considerouse **CDTX subclínica** un descenso do %SGL > 12% con respecto ao basal

- Mostras basais de pacientes que manifestan signos de toxicidade o longo do tratamento quimioterápico (**CDTX basal**).
- Mostras no momento no que os pacientes mostran signos de CDTX subclínica (7 meses en media) (**CDTX  $\Delta$ %SGL**).
- Mostras basais de pacientes que non manifestan signos de toxicidade o longo do tratamento quimioterápico (**Control basal**).
- Mostras de pacientes que non manifestan signos de toxicidade o longo do tratamento quimioterápico tomadas en tempo e doses acumuladas similares ao grupo con CDTX subclínica (6 meses) (**Control  $\nexists$  $\Delta$ %SGL**).



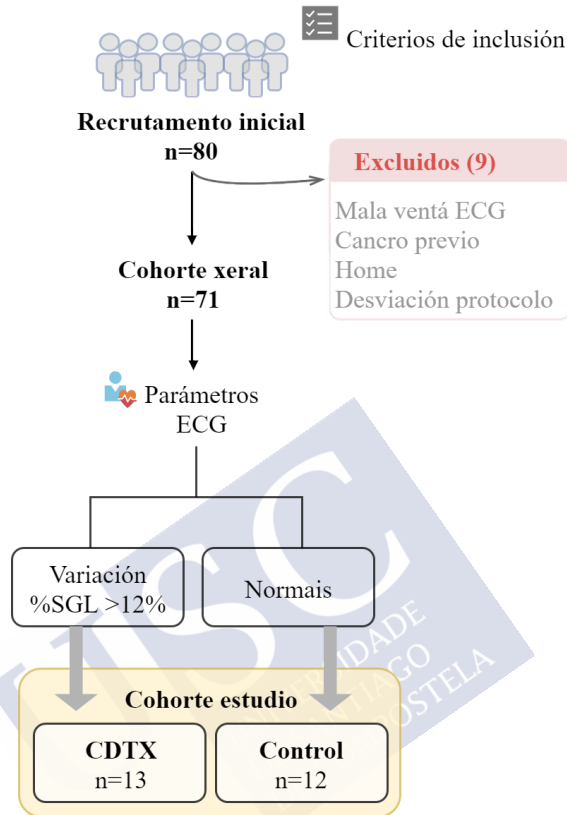


Figura 10. Diagrama de fluxo do deseño dos grupos de estudo.

### 3.1.3.1 Obtención de plasma

Unha vez recibidas as mostras das pacientes, centrifugouse un tubo con ácido e etilendiaminotetraacético (EDTA) a 1370 xg durante 10 minutos para separar plasma e pellet de células sanguíneas. Almacenouse o plasma a -80°C ata o seu uso.

### 3.1.3.2 Illamento de *PBMCs*

As *PBMCs* obtivéronse a partir de sangue total por centrifugación en gradiente utilizando *Histopaque-1077*. O *Histopaque-1077* é unha solución do polisacárido ficoll e un medio de contraste radiopaco, diatrizoato de sodio. A baixa viscosidade do ficoll permite crear unha capa osmótica que deixará pasar as células de maior

densidade, como granulocitos e eritrocitos, e reterá aquelas de menor densidade, os linfocitos. O sangue anticoagulado (EDTA) diluíuse aproximadamente 1:2 con solución salina tamponada con fostato (*Phosphate Buffered Saline, PBS*). Engadíronse a 4 ml de *Histopaque-1077* (*Sigma-Aldrich*) 6 ml de sangue total diluída e centrifugouse sen freno a 700 g durante 25 minutos a temperatura ambiente. Unha vez rematada a centrifugación, as *PBMCs* condensáronse na interfase entre o *Histopaque* e o plasma. Retiráronse e resuspendéronse en medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (*Sigma-Aldrich*) suplementado con 10% de soro bovino fetal (SBF) (*Gibco*) antibióticos (100 UI/mL penicilina, 100 µl/mL estreptomicina) (*Sigma-Aldrich*) e L-glutamina a 2 mM (*Sigma-Aldrich*) (RPMI completo). Centrifugouse a suspensión a 220 xg durante 10 minutos, descartouse o sobrenadante e lavouse de novo con medio RPMI completo. Despois dos lavados, conxeláronse as *PBMCs* en SBF con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*) a unha densidade aproximada de 2 millóns de células por críotubo, e almacenáronse a -80°C ou en nitróxeno líquido.

### 3.1.4 Estudo do patrón de expresión dos microARNs

#### 3.1.4.1 Extracción de microARNs do plasma e *PBMCs*

Os plasmas foron retirados de -80°C a -20°C 24 horas antes de comezar coa extracción. Para a correcta desconxelación, os tubos de plasma foron incubados nun baño a 37°C ata a completa disolución das sales. Utilizouse o *miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit* (*Qiagen*) para a purificación de ARN total, incluíndo aos microARNs, seguindo as instrucións do fabricante. Foron utilizados 600 µl de plasma como material inicial. Os microARNs foron extraídos da fase acuosa mediante ensaio de purificación a base de membrana de sílice. O ARN foi eluído en 20 µl de auga libre de nucleasas e almacenouse a -80°C ata o seu posterior uso.

Para a obtención de microARNs procedentes das *PBMCs* utilizouse o *miRNeasy micro kit* (*Qiagen*) seguindo as instrucións do fabricante. Este kit combina a lise en base fenol e guanidina das mostras e unha purificación do ARN total a base de membrana de sílice. O *QIAzol lysis reagent* é unha solución monofásica de fenol e tiocianato de guanidina

que facilita a lise dos tecidos, inhibindo as ARNasas e eliminando a meirande parte de ADN e proteínas por extracción orgánica. O procedemento comezou desconxelando rapidamente os viais procedentes de nitróxeno líquido que conteñen as *PBMCs* en SBF con 10% de DMSO. Decantouse o vial en medio RPMI e centrifugouse a 220 xg durante 5 minutos. Posteriormente contáronse as células utilizando unha cámara *Neubauer* e tinción con azul tripán (colorante vital) e recolleuse un millón das mesmas como material inicial para a extracción. Laváronse as células con *PBS* e obtívose o sedimento celular mediante centrifugación 220 xg durante 5 minutos. Engadeuse o *QIAzol lysis reagent* para homoxeneizar as células e engadiuse cloroformo, o que, despois de centrifugar, separa o homoxenado en fase orgánica e fase acuosa. Esta última é a que contén o ARN total. A mostra centrifugouse utilizando as columnas con membrana de sílice e lavouse con solventes en base etanol. O ARN total foi eluído en 14 µl de auga libre de nucleasas e almacenouse a -80°C ata o seu posterior uso.

#### 3.1.4.2 Cuantificación microARNs

A cantidade e a calidade do ARN procedente de plasma e *PBMCs* foi determinada usando o *Agilent 2100 Bioanalyzer ARN 6000 Pico kit* (Agilent) seguindo as instrucións do fabricante. O *Agilent 2100 Bioanalyzer* é un sistema de electroforese automática que permite cuantificar e avaliar a calidade de biomoléculas. Os datos da electroforese son analizados automaticamente polo *software* desenvolvido por Agilent. O *Agilent 2100 Bioanalyzer ARN 6000 Pico kit* permite a análise de mostras cunha cantidade limitada de ARN, dende 50 pg/µl ata 250 pg/µl, o que o fai ideal para a cuantificación de microARNs (Figura 11).

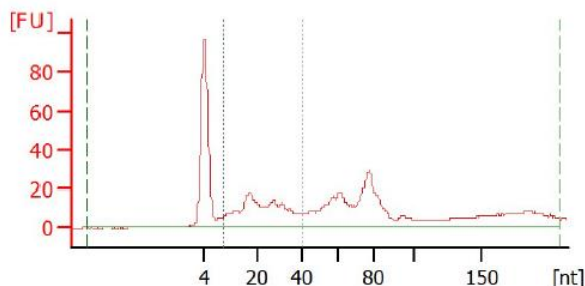


Figura 11. Electrorferograma típico da cuantificación de micoARNs no Bioanalyzer.

#### 3.1.4.3 Secuenciación microARNs

O estudo de secuenciación de microARNs nas mostraz realizouse en colaboración coa Unidade de Xenómica do Centro Nacional de Investigacións Cardiovasculares do Instituto de Saúde Carlos III (CNIC). Alí, foron utilizados 6  $\mu$ l de ARN como material inicial para a creación de librerías miARN-seq codificadas con código de barras usando *NEBBext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina* (New England Biolabs). Foron ligados os adaptadores SR 3' e 5' á mostra de ARN. Posteriormente realizouse una reversotranscrición seguida por unha amplificación por reacción en cadea da polimerasa (PCR) para enriquecer os fragmentos de ADNc con adaptadores a ámbolos lados. A cantidade e a calidade das librerías de microARNs foi determinada utilizando o *Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip*. As librerías foron secuenciadas nun *HiSeq2500* (Illumina) para xerar lecturas individuais de 60 bases. Os arquivos *FastQ* para cada mostra obtivéronse usando *bcltofastQ 2.20 Software* (Illumina).

#### 3.1.4.4 Validación de microARNs de plasma e análise do patrón de expresión dos microARNs no plasma e *PBMCs*

##### 3.1.4.4.1 Obtención de ADNc de microARNs

O ADNc obtívose empregando o kit comercial *TaqMan advanced miRNA cDNA Synthesis kit* (Applied Biosystems) seguindo as instrucións do fabricante. Utilízase como de partida 2  $\mu$ l de ARN extraído do plasma e das *PBMCs*. O proceso de síntese (Figura 12) lévase a cabo nun termociclador (*Bibby Scientific*) segundo as

condicións detalladas na táboa ao longo das reaccións detalladas a continuación (Táboa 2).

1. Reacción de poliadenilación: a poli(A) polimerasa engade unha cola 3'-adenosina ao microARN.
2. Ligamento do adaptador: este únese á cola poli(A) no extremo 5'. O adaptador actúa como o sitio de unión do cebador directo para a reacción de amplificación dos microARNs.
3. Retrotranscripción: o cebador universal de retrotranscripción únese ao extremo 3' da cola poli(A) e o microARNs é transcrito de maneira inversa, obtendo desta maneira o ADNc.
4. Amplificación, na que os cebadores directo e indirecto incrementan o número de moléculas de ADNc. Tódalas reaccións son levadas a cabo nun termociclador.

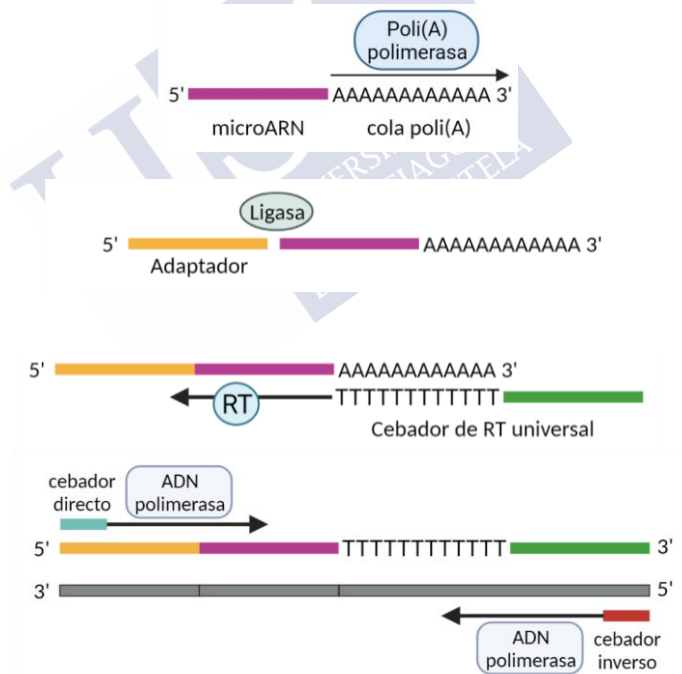


Figura 12. Proceso de síntese do ADNc a partir de microARNs. Realiada en BioRender.com

Táboa 2. Ciclos de temperaturas para a obtención do ADNc

Paso	Temperatura	Tempo	Ciclos
POLIADENILACIÓN			
Poliadenilación	37°C	45'	
Parada da reacción	65°C	10'	
Mantemento	4°C	∞	
LIGAMENTO DO ADAPTADOR			
Ligamento	16°C	60'	
Mantemento	4°C	∞	
RETROTRANSCRIPCIÓN			
Transcrición Inversa	42°C	15'	
Parada da reacción	85°C	5'	
Mantemento	4°C	∞	
PREAMPLIFICACIÓN			
Activación enzimática	95°C	5'	1
Desnaturalización	95°C	3"	
Hibridación/Extensión	60°C	30"	14
Parada da reacción	99°C	10"	
Mantemento	4°C	∞	

O produto resultante da retrotranscrición é entón un híbrido complementario do adaptador, o microARN e a cola poli(A).

#### 3.1.4.4.2 PCR en tempo real (qPCR)

A PCR en tempo real (qPCR) foi realizada utilizando a tecnoloxía *TaqMan*. Os ensaios *TaqMan* para microARNs constan de cebadores específicos dos microARNs e unha ou máis sondas optimizadas para a cuantificación dos mesmos. As sondas conteñen un colorante indicador (*reporter dye* FAM) no extremo 5' da sonda, un apagador non fluorescente (*quencher*, *NFQ*) no extremo 3', que permite ao sistema qPCR medir as contribucións ao colorante indicador con máis precisión, e unha unión ó suco menor (*minor groove binder*, *MGB*) que incrementa a temperatura de *melting* sen incrementar a lonxitude da sonda permitindo o deseño de sondas cortas. Cando a sonda está intacta, a proximidade do colorante indicador e do apagador suprime a fluorescencia do indicador.

Durante a qPCR, os cebadores directo e indirecto alíñanse ás secuencias complementarias ao longo dos filamentos desnaturizados do ADNc molde. O cebador indirecto solapa parcialmente co

microARN. A sonda alíña especificamente a unha secuencia complementaria entre os sitios dos cebadores directo e indirecto.

Durante a polimerización, a ADN polimerasa rompe a sondas, liberando ao o indicador, o que resulta na emisión de fluorescencia. O incremento de fluorescencia ocorre so se a sonda é complementaria coa secuencia diana e se esta secuencia é amplificada durante a PCR. A polimerización do filamento continúa, pero cando o extremo 3' da sonda está bloqueado, non se produce a extensión da sonda durante a PCR (Figura 13).

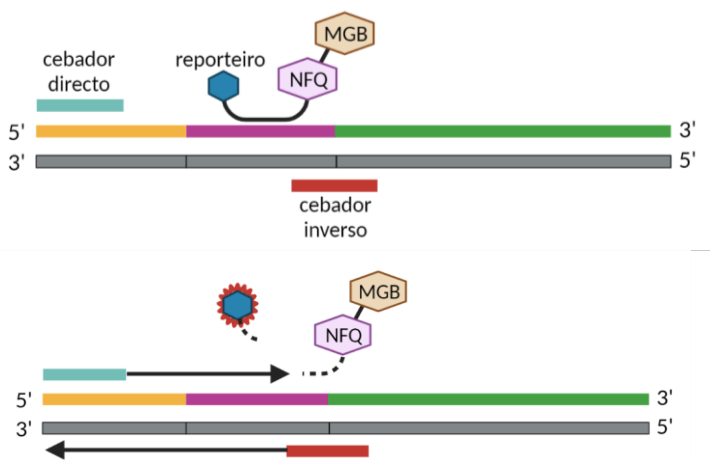


Figura 13. qPCR TaqMan

A qPCR levouse a cabo nun termociclador 384 *QuantStudio 5* (*Applied Biosystems*) segundo as condicións detalladas na Táboa 3. Cada mostra cargouse por triplicado utilizando 2,5 µl de ADNc diluído 1:10. As sondas utilizadas (*TaqMan Advanced miARN Assays*) foron as detalladas na Táboa 4 e a máster mix foi *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (*Applied Biosystems*).

Táboa 3. Ciclos de temperaturas empregados para a qPCR.

Paso	Temperatura	Tempo	Ciclos
Activación enzimática	95°C	20"	1
Desnaturalización	95°C	1"	40
Hibridación/Extensión	60°C	20"	

Táboa 4. Sondas *TaqMan* utilizadas e bibliografía empregada para a súa elección.

<i>miRNA Assays</i>	Ref. Qiagen	Bibliografía
hsa-mir-101-3p	477863_mir	200-205
hsa-mir-122-5p	477855_mir	206-214
hsa-mir-142-3p	477910_mir	129,205,215-219
hsa-mir-144-3p	477913_mir	205,220-222
hsa-mir-193-5p	478742_mir	223-225
hsa-mir-195-3p	478744_mir	226-228
hsa-mir-20a-5p	478586_mir	229-232
hsa-mir-32-5p	478026_mir	233-236
hsa-mir-340-5p	478042_mir	237-239
hsa-mir-374a-3p	478855_mir	240-242
hsa-mir-483-5p	478432_mir	243-247
hsa-mir-511-5p	478970_mir	248
hsa-mir-652-3p	478189_mir	249-253
<i>miRNA Assays referencia</i>		
hsa-miR-361-5p	478056_mir	
hsa-miR-423-5p	478090_mir	
hsa-miR-191-5p	477952_mir	
hsa-miR-26-5p	477995_mir	

### 3.1.5 Predición de dianas dos microARNs (*targeting*) e análise de enriquecemento de sets de xenes (*GSEA*)

Realizouse unha análise *in silico* dos xenes diana (*targeting*) dos microARNs que presentaron diferencias significativas na validación por qPCR mediante o uso de *miRWalk 2.0* (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de>), unha base de datos pública que utiliza múltiples algoritmos para a identificación de xenes diana dun ou máis microARNs, ou a identificación de microARNs dos que sexan diana un ou máis xenes. O *miRWalk 2.0*, ademais de documentar sitios de unión dos microARNs coa secuencia completa dun xen, combina esta información cunha comparación dos sitios de unión resultantes dos distintos algoritmos de predición: ANA-microTv4.0, DIANA-microT-CDS, miRanda-rel2010, mirBridge, miRDB4.0, miRmap, miRNAMap, PicTar2, PITA, RNA22v2, RNAhybrid2.1 e Targetscan6.2.

Utilizouse na análise o módulo de predición de interaccións microARN-ARNm validadas experimentalmente procedentes de distintas bases de datos: miRTarBase, PhenomiR2.0, miR2Disease e



HMDD. Realizáronse 4 tipos de buscas combinadas nas seguintes comparativas:

- Estudo basal en plasma
- Estudo lonxitudinal en plasma
- Estudo basal en *PBMCs*
- Estudo lonxitudinal en *PBMCs*

Unha vez obtidas as dianas para cada conxunto de microARNs, realizouse un análise de enriquecemento (*Gen Set Enrichment Analysis, GSEA*), mediante o uso da ferramenta online **EnrichR** (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), para estudar as rutas *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database*) que se atopan enriquecidas coas dianas resultantes do estudo de predición.

### 3.1.6 Estudo de adipokinas en plasma

#### 3.1.6.1 Ensaio por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

A determinación dos niveis de OMT circulante levouse a cabo mediante un ensaio por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) co kit *Human Omentin-1 ELISA* (*BioVendor*) seguindo as instrucións do fabricante.

As mostras foron retiradas de -20°C e diluídas 1:40 (Táboa 5) en tampón de dilución xusto antes do comezo do ensaio segundo as recomendacións do fabricante. As mostras incubáronse xunto cos estándares a 30°C nunha microplaca precuberta co anticorpo policlonal anti-OMT durante 2 horas. Os estándares utilizáronse para a realización dunha curva de concentracións coñecidas que permitiu unha determinación cuantitativa das mostras estudo en base a absorbancia. Despois da incubación e os lavados con solución de lavado para eliminar material proteico non unido, engadiuse anticorpo anti-OMT biotinilado e incubouse de novo durante 30 minutos. Seguido dun lavado, incubouse co conxugado estraptavidina peroxidasa durante 30 minutos, lavouse con solución de lavado para eliminar o conxugado non unido a anti-OMT biotinilado, e aquel unido é o que reacciona coa

solución de substrato, dando un color amarelado á solución. A reacción parouse con solución acídica e medíronse as absorbancias nun lector de microplacas (*Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher*) a 450 nm e 620 nm. A absorbancia é proporcional á concentración de OMT. Realizouse unha curva estándar e as concentracións das mostras extrapoláronse a partir desta.

### 3.1.6.2 LUMINEX

A determinación dos niveis circulantes de adipoQ, FABP4 e Gal-3 mediante un ensaio *Luminex (R&D)* segundo as recomendacións do fabricante.

O ensaio *Luminex* é un inmunoensaio no que os anticorpos específicos do analito a estudar recobren micropartículas magnéticas incrustadas con fluoróforos. As mostras foron retiradas de -20°C e diluídas (Táboa 5) xusto antes do comezo do ensaio segundo as recomendacións do fabricante. Os estándares e as mostras incúbanse coas micropartículas nunha placa de 96 pozos durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar con tampón de lavado, co fin de eliminar calquera sustancia non unida que poida proporcionar unha sinal inespecífica, incúbase cada pozo cun cóctel de anticorpo biotinilado específico dos analitos de interese, engadiuse a cada pozo. Seguido dun lavado para eliminar calquera anticorpo biotinilado non unido, engadiuse a cada pozo o conxugado estreptavidina-ficoeritrina (SPE), o cal se une ó anticorpo biotinilado. Un lavado final elimina o SPE non unido. Resuspendéronse as micropartículas en tampón e léronse no *Luminex MAGPIX Analyzer*. Un imán no analizador captura e retén as micropartículas supermagnéticas nunha monocapa. Dous diodos emisores de luz (LED), espectralmente distintos, iluminan as micropartículas. Un LED excita os tintes dentro de cada micropartícula para identificar a rexión e ás micropartículas. Un segundo LED excita o SPE para medir a cantidade de analito unido á micropartícula. A mostra de cada pozo e capturada cunha cámara de dispositivo de carga acoplada cun set de filtros para diferenciar os niveis de excitación. As concentracións de cada adipokina calcúlanse a partir das curvas patrón xeradas a partir das concentracións dos estándares dos calibradores para cada adipokina, incluídos en cada ensaio segundo o protocolo.

Táboa 5. Concentración utilizadas nos inmunoensaios.

Adipokina	Dilución recomendada
OMT	1:40
AdipoQ	1:200
FABP4	1:2
Gal3	1:50
CCL2	1:2



### 3.2 ESTUDOS *IN VITRO*

#### 3.2.1 Cultivo celular e reactivos

Utilizouse unha liña inmortalizada de cardiomioblastos ventriculares embrionarios de rata H9c2 (*ATCC*) dado que estas células manteñen as características morfolóxicas dos cardiomiocitos embrionarios inmaturos con elementos de vías de sinal eléctrica e hormonais das células cardíacas adultas, ademais das semellanzas enerxéticas cos cardiomiocitos primarios<sup>254</sup>.

As H9c2 sementáronse en placas recubertas con xelatina de pel de porco do 10% en H<sub>2</sub>O con medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (*DMEM*) (*Sigma-Aldrich*) complementado con soro bovino fetal (SBF) ao 10%, antibióticos (100 UI/mL penicilina (*Sigma-Aldrich*), 100 µl/mL estreptomicina (*Sigma-Aldrich*)) e L-glutamina (*Sigma-Aldrich*) a 2 mM (*DMEM* completo), nunha atmosfera do 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C. Para o mantemento no tempo da liña, as células sementáronse en placas p100 e expandíanse ó chegar ó 80% da súa confluencia, momento no cal requiren un novo pase. As células levántanse do fondo da placa incubando con tripsina 1x (0,25% EDTA) (*Sigma-Aldrich*) durante 2-3 minutos a 37°C. Unha vez en suspensión, inactívase a tripsina con medio *DMEM* completo e dilúense a unha ratio 1:3. Ao chegar a unha confluencia do 80%, as células H9c2 foron sementadas en placas multipozo, segundo o ensaio a realizar, 24 horas antes de recibir tratamentos, e tratadas con medio completo sen SBF, 12 horas previas dos procedementos experimentais.

En todos os experimentos as células foron tratadas durante 24 horas, salvo que se indique o contrario con omentina (OMT, *Biovendor*), N-acetil-L-cisteína (NAC, *Sigma-Aldrich*) e docetaxel (DTX, *Sigma-Aldrich*) nas concentracións indicadas na Táboa 6. Os grupos control foron tratados con medio de cultivo e o solvente correspondente

Táboa 6. Reactivos utilizados nos tratamentos celulares.

Reactivo	Concentración de traballo
DTX	25 nM
OMT	300 ng/ml
NAC	4 nM

### 3.2.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida de forma indirecta utilizando ensaio MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) (*Sigma-Aldrich*). O MTT é utilizado habitualmente como medida de proliferación celular. Produce unha solución amarelenta que é convertida polas deshidroxenases das mitocondrias en formazán, uns cristais azul escuro. Unha maior actividade mitocondrial queda reflexada nunha maior cantidade de cristais de formazán. Estes disólvense con DMSO:isopropanol (1:1). A determinación da intensidade colorimétrica medida mediante absorbancia a unha lonxitude de onda de 570 nm proporciona unha medida indirecta da viabilidade celular. Transcorrido o tempo de tratamento segundo se indica no ensaio correspondente, incubáronse as mostras co MTT a unha concentración de 0,5 mg/ml durante 4 horas solubilizouse e cuantificouse nun espectrofluorómetro (*Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher*).

As H9c2 foron cultivadas a unha densidade de 5000 células/0,8 cm<sup>2</sup> en placas de 96 pozos para realizar ensaio de dose resposta e de cotratamento con OMT. Co fin de establecer a dose óptima de traballo, as células foron tratadas nun primeiro ensaio con doses crecentes de DTX (0,25 nM, 2,5 nM, 5, nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 500 nM, 1 nM e 10 nM), e o seu control-durante 24 horas. Posteriormente realizouse o ensaio de cotratamento con OMT e DTX coas doses e tempos indicados anteriormente.

### 3.2.3 Citometría de fluxo

#### 3.2.3.1 Análise de apoptose

A apoptose foi medida usando fluoresceína isotiocianato (FITC) *Anexina-V-FLUOS staining kit (Roche Diagnostics)* de acordo co protocolo do fabricante. As células H9c2 foron incubadas con DTX e/ou OMT ás concentracións e tempos anteriormente indicados, a unha densidade de  $5 \times 10^5$  células/ml. Unha vez transcorrido o tempo de tratamento, as células foron tripsinizadas e centrifugadas a 200 xg durante 5 minutos. As células foron tinguidas con Anexina-V-FITC (AV) e Ioduro de Propidio (IP), previamente diluídos con tampón de incubación HEPES. A anexina é unha proteína de unión a fosfolípidos

con alta sensibilidade pola fosfatidilserina, a cal se expón de xeito específico na membrana celular nas fases iniciais da apoptose, mentres o IP se intercala no ADN indicando a entrada da célula na fase de necrose celular. Despois de incubar a suspensión durante 10-15 minutos a temperatura ambiente e en escuridade mediuse a fluorescencia mediante citometría de fluxo usando *FACScan* (*Becton Dickinson*) e analizando, con un recuento de eventos situado en 5000 células dentro da rexión de interese. As poboacións de células son definidas como necróticas (IP+), apoptóticas (AV+) ou apoptóticas temperás (AV+/IP+). Realizouse unha análise de FL1 (FITC) ou FL3 (IP) nun *dotplot* onde se observou a porcentaxe de positividade comparada cos controis negativos.

### 3.2.3.2 Análise de especies reactivas de osíxeno (EROs)

As H9c2 foron tratadas con DTX e/ou OMT e/ou 1 hora de pretratamento con NAC nas concentracións anteriormente indicadas. As células en cultivo foron lavadas con *PBS*, tripsinizadas e resuspendidas en medio *Hanks Balanced Salt Solution* (*HBSS*) libre de vermello fenol (*Sigma- Aldrich*) a unha densidade de  $5 \times 10^5$  células/ml. As mostras foron incubadas con  $5 \mu\text{M}$  dihidroetidio (DHE) (*Sigma- Aldrich*) durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en condicións de escuridade. O DHE é un biomarcador específico do anión superóxido total ( $\text{O}_2^-$ ). Despois da incubación, as células foron lavadas dúas veces en *PBS* frío para eliminar o exceso de tinguidura. As EROs ( $\text{O}_2^-$ ) foron medidas mediante citometría de fluxo usando *FACScan* (*Becton Dickinson*) e analizando, con un recuento de eventos situado en 5000 células da rexión de interese. Os resultados no software *CellQuestPro* (*Bencton Dickinson*) no canal FL2. A autofluorescencia en cada mostra foi eliminada.

## 3.2.4 Análise de expresión xénica

### 3.2.4.1 Extracción de ARN e cuantificación

Para a extracción de ARN de células en cultivo utilizouse *TRIzol* (*Invitrogen*) seguindo as especificacións do fabricante. O *TRIzol* é unha solución monofásica de fenol e isotiocinato de guanidina

que permite a separación do ARN nunha fase acuosa despois da adición de cloroformo.

As células cultiváronse en multiplacas de 12 pozos a unha concentración de  $2,5 \times 10^4$  células/ $3,5 \text{ cm}^2$ , e os tratamentos realizáronse a 6 pozos por condición (control, OMT, DTX, DTX+OMT) nos tempos e condicións anteriormente indicados. Unha vez transcorridas as 24 horas de tratamento retirouse o medio de cada pozo mediante aspiración e elimináronse os restos de medio mediante un lavado con 0,5 ml de PBS, co fin de evitar que afecte á eficiencia da reacción.

A continuación, engadíronse 500  $\mu\text{l}$  de TRIzol® en cada pozo e desprendéronse as células coa axuda dun rascador de células ou *scraper*. Unha vez despegadas recolléronse a un microtubo de 1,5 ml. Neste momento engadíronse 250  $\mu\text{l}$  de cloroformo a cada tubo, volteouse 3-4 veces manualmente e deixouse repousar 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente centrifugáronse os tubos a 21100 xg durante 15 minutos e a 4°C. Isto permite a separación da mostra en 3 fases: fase orgánica, interfase e fase acuosa. A fase acuosa transferiuse a un novo microtubo de 1,5 ml con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol, volteáronse 3-4 veces para mesturar e almacenáronse a -20°C durante polo menos 15 minutos. O isopropanol precipita o ARN, deshidratándoo e levándoo ao fondo do tubo. Transcorrido o tempo centrifugáronse os tubos durante 15 minutos a 21100 xg e 4°C e descartouse o sobrenadante. Por último, realizáronse dous lavados con etanol, primeiro a 70% e despois a 100%, durante 10 minutos e a 4°C. Descartouse de novo o sobrenadante e deixáronse evaporar os restos de etanol que puideran quedar no pellet para despois resuspender o ARN xa purificado en 10-13  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O tratada con dietil policarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC), que inactiva as enzimas RNasas na auga. As concentracións e calidade do ARN de cada mostra se determinaron medindo a absorbancia a 260nm e relacións de absorbancia 260nm/280nm e 260nm/230nm con un espectrofotómetro NanoDrop (*Thermo Fisher*) que mide a cantidade de ARN mediante espectrofotometría UV-visible.

#### 3.2.4.2 Retrotranscripción

A obtención ADNc a partir do ARN levouse a cabo co *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Scientific*)

seguindo o protocolo do fabricante (Táboa 7). Utilizouse como material inicial 1 µg de ARN e preparouse unha mestura final de 20 µl. O procedemento levouse a cabo nun termociclador (*Bibby Scientific*)

Táboa 7. Ciclos de temperaturas da retrotranscripción.

Paso	Temperatura	Tempo
Activación enzimática	25°C	5'
Retrotranscripción	42°C	60'
Parada da reacción	70°C	5'
Mantemento	4°C	∞

### 3.2.4.3 PCR en tempo real (qPCR)

A qPCR realizouse nun termociclador *Realplex Mastercycler epgradient S* (Eppendorf). Para o desenvolvemento do protocolo utilizáronse os reactivos detallados na Táboa 8. O *SYBR Green* (Roche) é unha marcaxe específica de dobre cadea de ADN. Durante cada fase de síntese de ADN, o *SYBR Green* únese aos produtos de PCR amplificados, podendo detectarse o amplicón por fluorescencia. Previamente, a mostra de ADNc foi diluída 1:5 con auga miliQ estéril.

Táboa 8. Reactivos utilizados en cada reacción de qPCR.

Reactivos	Volume/Reacción
SYBR Green ROX	10 µl
Cebador directo	0,2 µl
Cebador inverso	0,2 µl
H <sub>2</sub> O	7,6 µl
cDNA	2 µl
<b>Volume total</b>	<b>20 µl</b>

Os cebadores específicos para a detección dos xenes de interese móstranse na Táboa 9.

Táboa 9. Cebadores específicos para cada xen.

Xen	Cebador directo (5'→3')	Cebador inverso (3'→5')
<b>BiP</b>	GAGGCGTATTTGGGAAAGAA	TCATGACATTTCAGTCCAGCAA
<b>CHOP</b>	ACCACCACACCTGAAAGCA	AGCTGGACACTGTCTCAAAGG
<b>ATF6</b>	GGACCAGGTGGTGTCTCAGAG	GACAGCTCTGCGCTTTGG
<b>XBP1</b>	GCTGAGTCCGCAGCAGGT	ACAGGGTCCAACCTTGCCAG
<b>GAAD34</b>	GCTTTTGGCAAACCGAAC	TTCCAGTGCAGGACATGCT



MCPIP	TGGTCATCGACGGAAGCAAC	CCGCTCCAGAAACCAGTTCA
CAT	GCGAATGGAGAGGCAGTGTAC	GAGTGACGTTGTCTTCATTAGCACTG
GPx	CTCTCCGCGGTGGCACAGT	CCACCACCGGGTCGGACATAC
SOD1	GCAGAAGGCAAGCGGTGAAC	TAGCAGGACAGCAGATGAGT
NOX1	CTGACAAGTACTATTACAGAGAG	CATATATGCCACCAGCTTATGGAAG
NOX2	CTTTAGCATCCATATCCGCATT	GACTGGTGGCATTGTCACAATA
NOX4	TGTTGGGCCTAGGATTGTGT	GTGCGGCACATGGGTAAAAG
36B4	GGCGTCCTCATTAGAGTGACA	TAGTTGGACTTCCAGGTCGC

### 3.2.5 Análise de expresión proteica

#### 3.2.5.1 Extracción de proteína e cuantificación

Para a obtención de extracto proteico procedente de cultivo celular levouse a cabo a disrupción das células cun tampón de lise (Táboa 10). Partindo de células en cultivo en multiplacas de 6 pozos, cunha densidade de  $5 \times 10^5$  células/9,6cm<sup>2</sup>, e despois de 24 horas de tratamento a 3 pozos por condición (control, OMT, DTX, DTX+OMT) ás concentracións anteriormente indicadas, retirouse o medio de cultivo e engadiuse PBS. Con axuda dun *scraper* levantáronse as células do fondo da placa. A suspensión recolleuse a un microtubo, e obtívose o sedimento celular mediante centrifugación a 21100 xg. Descartouse o sobrenadante, resuspendeuse o pellet en 100 µl de tampón de lise e arrefriouse en xeo durante 1 hora.

Táboa 10. Composición do tampón de lise celular.

Reactivo	Concentración/proporción
Tris-HCl pH 7,5	50 mmol/l
EGTA	1 mmol/l
EDTA	1 mmol/l
Triton X-100	1%
Ortovanadato de sodio	1 mmol/l
Fluoruro de sodio	50 mmol/l
Pirofosfato de sodio	5 mmol/l
Sacarosa	0,27 mol/l
2-mercaptoetanol	0,1%
C0mplete (Roche)	1x

Unha vez transcorrido este tempo, volvéronse centrifugar os tubos durante 15 minutos a 21100 g e a 4°C. Recuperouse o sobrenadante a novos tubos e procedeuse á cuantificación das proteínas. A

cuantificación realizouse mediante un ensaio colorimétrico baseado no ensaio de Lowry, co kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad), mediante unha recta patrón de concentración coñecida con albúmina de soro bovino (*Bovine serum albumin, BSA*) (Sigma-Aldrich), seguindo as instrucións do fabricante. Medíronse as absorbancias nun lector de microplacas (*Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher*), a 450 nm e 620 nm. A absorbancia é proporcional á concentración de proteína, polo que se calcula a concentración das proteínas estudo a partir da recta patrón.

Unha vez coñecida a concentración das proteínas, procedeuse á preparación das mostras co tampón de carga, que se prepara 5X coa composición detallada na Táboa 11. Cargáronse 20 µg de proteína por pozo, nun volume final de 35 µl co tampón de carga a 1X. Antes de cargar as comezar co *Western Blot*, desnaturalizáronse as mostras a 95°C durante 10 minutos, co obxectivo de que as proteínas perdan a súa estrutura tridimensional.

Táboa 11. Tampón de carga para a electroforese.

Reactivo	Concentración/proporción (5X)
Tris-HCl	0,0625 M
SDS	5%
Glicerol	10%
2-B-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0,0025%

### 3.2.5.2 Western blot

Realizouse a separación das proteínas mediante electroforesis en xel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*SDS-PAGE*). Ditos xeles constan de dúas fases, unha inferior que permite a separar ás proteínas en base ao seu peso molecular (xel separador) en función da concentración de acrilamida empregada e outra superior que condiciona que as mostras entren no xel separador de forma simultánea (xel concentrador) (Táboa 12). Debido ao baixo peso molecular das proteínas de estudo o xel separador preparouse a unha porcentaxe de acrilamida do 13%.

Táboa 12. Composición dos xeles para a electroforese.

Reactivo	Xel concentrador	Xel separador
H <sub>2</sub> O	10 ml	7,1 ml
Tampón A (Tris-HCl 1M)		10 ml
Tampón B (Tris-HCl 1,5M)	12 ml	
Acrilamida	13 ml	2,6 ml
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	75 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Persulfato de amonio (APS)	120 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Levou-se a cabo a electroforese a unha voltaxe fixa de 130 V durante 90-120 minutos en tampón de electroforese 1x (Táboa 13).

Táboa 13. Composición do tampón de electroforese.

Reactivo	Concentración/proporción (5X)
Glicina	20 mM
Tris-Base	200 mM
SDS	1% p/v

Unha vez finalizada a migración das proteínas, procedeuse á transferencia destas á membrana de nitrocelulosa. Antes da transferencia activáronse as membranas durante 5 minutos de forma consecutiva en metanol, auga destilada e finalmente en tampón de transferencia 1x (Táboa 14). Realizouse unha transferencia semiseca durante 30 minutos a unhas condicións de amperaxe e voltaxe de 25V e 1A nun sistema de transferencia *Trans-Blot Turbo* (Bio-Rad).

Táboa 14. Composición do tampón de transferencia.

Reactivo	Concentración/proporción (25X)
Glicina	40 mM
Tris-Base	40 mM
Metanol	20%
SDS	0,36% p/v

Ao finalizar a transferencia bloqueáronse as membranas durante unha hora con BSA 5% en solución tamponada con tris(*TBS*)-*Tween* 0,1 % a temperatura ambiente co fin de evitar unións inespecíficas do anticorpo.

Unha vez bloqueadas as membranas, procedeuse á incubación cos anticorpos primarios correspondentes ás proteínas estudo (Táboa 15).

Estes uníranse de forma específica a proteína de estudo. A incubación co anticorpo primario levouse a cabo seguindo as recomendacións de dilución indicadas polo fabricante, a 4°C e en axitación para facilitar a unión do mesmo durante toda a noite. Tralo periodo de incubación e antes de incubar con anticorpo secundario, fanse lavados 3 sucesivos de 10 minutos e en axitación con tampón *TBS-Tween* 0,1% con obxectivo de reducir as unións inespecíficas do anticorpo primario. Incubouse co anticorpo secundario correspondente, seguindo as recomendacións de dilución indicadas polo fabricante (Táboa 15), durante unha hora a temperatura ambiente e en axitación. Finalizado o período de incubación leváronse a cabo 3 lavados sucesivos de 10 minutos e en axitación con tampón *TBS-Tween* 0,1% con obxectivo de reducir as unións inespecíficas do anticorpo secundario.

Para a determinación semi-cuantitativa das proteínas de estudo estableceuse unha proteína de expresión constitutiva e non regulada polas condicións experimentais, neste caso  $\beta$ -actina, con fin de garantir que as diferenzas observadas non se deban a erros na cuantificación ou carga das mostras. A incubación con anticorpo fronte a  $\beta$ -actina e o seu anticorpo secundario correspondente levouse a cabo seguindo as recomendacións de dilución indicadas polo fabricante (Táboa 15).

Táboa 15. Anticorpos utilizados para a inmunodetección por Western Blot

Anticorpo	kDa	Referencia	Dilución
<b>Anticorpos primarios</b>			
Proteínas estudo			
Anti-Caspasa 3	17, 19, 35	9662 (CS)	1:1000
Anti-Atf6 $\alpha$	90	sc166659 (SCB)	1:1000
Anti-BIP	78	sc376768 (SCB)	1:500
Anti-eIF2 $\alpha$	36	sc11386 (SCB)	1:1000
Anti-p-eIF2 $\alpha$	36	sc10670 (SCB)	1:500
Anti-CAT (H9)	64	sc271803 (SCB)	1:1000
Anti-GPx-1/2 (B-6)	23, 92	sc133160 (SCB)	1:100
Anti-SOD-1 (B-1)	23	sc271014 (SCB)	1:500
Control de carga			
Anti- $\beta$ -actina	42	A5316 (SA)	1:1000
<b>Anticorpos secundarios</b>			
Anti-coello IgG		7074 (CS)	1:3000
Anti-rato-Igs		P0447 (DAKO)	1:5000

A detección das proteínas levouse a cabo por quimioluminiscencia, utilizando o substrato de peroxidasa *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Bio-RAD)* sobre as membranas incubadas cos anticorpos. O *ECL* é un sistema que aproveita a oxidación do luminol pola peroxidasa do anticorpo secundarios en presenza de peróxido de hidróxeno coa consecuente emisión de luz, que exposto a unha película autorradiográfica (*Mamorray*) queda reflexado na mesma, a cal se revela automaticamente. Os tempos de incubación co *ECL* varían con respecto ós anticorpos secundarios utilizados. A exposición da película ao composto radiante realizouse a distintos tempos en función dos anticorpos secundarios utilizados. Posteriormente escaneáronse as películas radiográficas e realizouse a cuantificación co software de uso libre *ImageJ* (NIH).

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICO

Na análise dos datos dos pacientes, os datos represéntanse como caixas  $\pm$  mínimo/máximo, en histogramas media  $\pm$  erro estándar (EE), curvas COR % especificidade vs %sensibilidade, correlacións *dots* individuais e recta de regresión. A significancia estatística foi determinada por *Mann-Whitney*, *Wilcoxon*, área baixo a curva (*AUC*) e R de *Pearson*. No caso dos ensaios *in vitro* os resultados foron obtido de polo menos 3 experimentos distintos, os datos represéntanse e histogramas  $\pm$  erro estándar (EE). A significancia estatística foi obtida por *Mann-Whitney*, ANOVA seguido de *post hoc test Tukey* ou *Dunn* e test t de Student de dúas colas. Tódolos test estatísticos foron xerados no *GraphPad Prism 8 software*.

# RESULTADOS





## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTUDOS CLÍNICOS

#### 4.1.1 Características das pacientes

##### 4.1.1.1 Características basais da cohorte inicial

Tras 12 meses de seguimento, estableceuse unha cohorte inicial de estudo en base aos criterios de inclusión e exclusión establecidos anteriormente (Figura 10). Analizáronse os factores de risco e prescrición de tratamento CV previo, así como os parámetros bioquímicos e ecocardiográficos basais (Táboa 16).

A idade media das pacientes ao inicio do tratamento é de 52 anos ( $\pm 11$ ). En canto aos factores de risco CV cabe destacar que 14 (19,4%) son hipertensas, 18 (25%) consumen tabaco, e 7 (9,7%) padecen hiperlipidemia, cuns valores medios de colesterol total, LDL e TG de 213,8 ( $\pm 31,4$ ), 127,1 ( $\pm 15,4$ ) e 107,7 ( $\pm 60,2$ ) respectivamente. En canto aos parámetros ecocardiográficos a nivel basal a FEVE atópase nun 64% ( $\pm 5,4$ ) e o SGL é de -19 ( $\pm 12,8$ ). Un 9,7% recibe tratamento cardioprotector con  $\beta$ -bloqueantes, un 16,7% con iECAS ou ARAII e un 12,5% con estatinas.

Táboa 16. Características basais da cohorte inicial. Datos expresados como media  $\pm$  DE ou n (%).

Cohorte inicial (n=71)	
Anos ao diagnóstico	52 $\pm$ 11
Factores de risco CV	
ECV previa	2 (2,8)
Tabaquismo	18 (25)
HTA	14 (19,4)
DM	6 (8,3)
Dislipemia	7 (9,7)
IMC	27 $\pm$ 5
ECG	



FEVE (%)	64 ± 5,4
SGL (%)	-19 ± 12,8
<b>Bioquímica</b>	
Creatinina (mg/dL)	0,66 ± 0,19
Filtrado glomerular (mL/min)	131,8 ± 45,2
Glucemia (mg/dL)	93,5 ± 12,3
HbA1c (%)	5,41 ± 0,3
Hemoglobina (g/dL)	13,7 ± 1,1
Colesterol Total	213,8 ± 31,4
LDL (mg/dL)	127,1 ± 30,1
HDL (mg/dL)	58,8 ± 15,4
TG (mg/dL)	107,7 ± 60,2
pro-BNP (pg/mL)	58,1 ± 46,3
Troponina (pg/mL)	<0,017
HS-cTnl (pg/mL)	4,3 ± 2,9
P.C.R.	0,26 ± 0,35
<b>Tratamento CV</b>	
Beta-bloqueantes	7 (9,7)
iECA/ARAI	12 (16,7)
Estatinas	9 (12,5)

#### 4.1.1.2 Características da poboación de estudo

A poboación de estudo e os seus controis emparellados foron establecidos en base aos criterios ecocardiográficos de CDTX subclínica descritos na literatura científica e nas guías de práctica clínica. Un 18% das pacientes mostraron unha variación do *strain* global lonxitudinal (SGL) por riba do 12% ao longo do tratamento. En base a isto establecéronse 4 grupos de estudo.

- Mostras basais de pacientes que manifestan signos de toxicidade o longo do tratamento quimioterápico (**CDTX basal**).
- Mostras no momento no que os pacientes mostran signos de toxicidade subclínica (7 meses) (**CDTX Δ%SGL**).
- Mostras basais de pacientes que non manifestan signos de toxicidade o longo do tratamento quimioterápico (**Control basal**).
- Mostras de pacientes que non manifestan signos de toxicidade o longo do tratamento quimioterápico tomadas en tempo e doses acumuladas similares o grupo con CDTX subclínica (6 meses) (**Control ΔΔ%SGL**).

A idade media do grupo que desenvolve CDTX subclínica ao longo do tratamento quimioterápico (**CDTX**) é de 48 ( $\pm 13$ ). As porcentaxes de pacientes en canto aos factores de risco CV son un 46,2% das que consumen tabaco, un 7,7% padece HTA, un 14,4% DM e un 7,7% sofren dislipemia, cuns niveis de colesterol total, LDL e TG de 216,9 ( $\pm 29,7$ ) mg/dl, 125,1 ( $\pm 33,2$ ) mg/dl e 99,4 ( $\pm 49,7$ ) mg/dl respectivamente, parámetros que non mostran variacións significativas a nivel lonxitudinal. Atendendo aos parámetros ecocardiográficos, a FEVE a nivel basal encóntrase nun 64% ( $\pm 3,9$ ) e o SGL a -20 ( $\pm 12,9$ ). A FEVE varía significativamente a nivel lonxitudinal ( $62,2 \pm 3,3$ ) continuando en parámetros normais, en cambio o SGL varía significativamente ata -16,6% ( $\pm 12,1$ ). En canto ao tratamento cardioprotector, unha PACIENTE recibe  $\beta$ -bloqueantes (7,7%), unha recibe iECAs/ARAIIs (7,7%) e ningunha estatinas. O tratamento mantense a nivel lonxitudinal excepto en estatinas, que comezan tratamento 4 pacientes ao longo da quimioterapia (60,8 %) (Táboa 17).

A idade media ao inicio do grupo que non desenvolve CDTX subclínica (**Control**) é de 51 ( $\pm 8,6$ ). Atendendo aos factores de risco cv un 8,3% son consumidoras de tabaco e un 8,3% padecen dislipemia cuns valores de colesterol total, LDL e TG de 128,5 ( $\pm 30,4$ ) mg/dl, 128,5 ( $\pm 30,4$ ) mg/dl e 99,1 ( $\pm 39,5$ ) mg/dl respectivamente, os cales non varían de maneira significativa ao longo do tratamento quimioterápico. Os parámetros ecocardiográficos que presentan a nivel basal son unha FEVE de 62,9% ( $\pm 4,6$ ), o cal non varía a nivel lonxitudinal ( $63,8 \pm 5,2$ ), e o SGL encóntrase en -23,1 ( $\pm 1,6$ ), que da mesma maneira que a FEVE non presenta variación significativa aos 6 meses de tratamento quimioterápico ( $-22,4 \pm 1,7$ ). Unicamente unha doente recibe estatinas cando se inicia o tratamento (8,3%) (Táboa 17).

Táboa 17. Características basais e lonxitudinais, tipo tumoral e tratamento quimioterápico de ambos grupos ao longo do tratamento. Datos expresados como media  $\pm$  DE ou n (%). Significancia estatística: \*, \*\* e \*\*\*  $p < 0,05$ ,  $0,01$  e  $0,001$  respectivamente vs  $\text{Control}_{\Delta\% \text{SGL}}$ ; # e ###  $p < 0,05$  e  $0,001$  respectivamente fronte  $\text{CDTX}_{\text{basal}}$ ; & e &&  $p < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente vs  $\text{Control}_{\text{basal}}$ .

	Control (n=12)		CDTX (n=13)	
	Basal	Seguimento	Basal	Seguimento
Anos ao diagnóstico	51 $\pm$ 8,6		48 $\pm$ 12,7	
Factores de risco CV				
ECV previa	0		0	
Tabaquismo	1 (8,3)		6 (46,2)	
HTA	0		1 (7,7)	
DM	0		1 (7,7)	
Dislipemia	1 (8,3)		1 (7,7)	
IMC	27 (4)		26 (4,5)	
ECG				
FEVE	62,9 $\pm$ 4,6	63,8 $\pm$ 5,2	64 $\pm$ 3,9	62,2 $\pm$ 3,3*
SGL	-23,1 $\pm$ 1,6	-22,4 $\pm$ 1,7	-20 $\pm$ 12,9	-16,6 $\pm$ 12***,#
$\Delta\% \text{SGL}$ (meses)		6		7
Bioquímica				
Creatinina (mg/dL)	0,59 $\pm$ 0,1	0,55 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,12	0,62 $\pm$ 0,12
Filtrado glomerular (mL/min)	138,2 $\pm$ 17,8	159,6 $\pm$ 41,5	158,2 $\pm$ 56,8	135,5 $\pm$ 58,1
Glucemia (mg/dL)	92,3 $\pm$ 13,4	96,3 $\pm$ 12,3&	90,6 $\pm$ 8,2	105,9 $\pm$ 34,2
HbA1c (%)	5,34 $\pm$ 0,25	5,69 $\pm$ 0,18&	5,26 $\pm$ 0,28	5,5 $\pm$ 0,31
Hemoglobina (g/dL)	14,1 $\pm$ 1,2	12,4 $\pm$ 0,9	13,4 $\pm$ 0,9	11,9 $\pm$ 1**###
Colesterol Total	216,3 $\pm$ 27,4	224 $\pm$ 23,3	216,9 $\pm$ 29,7	207,2 $\pm$ 43,2
LDL (mg/dL)	128,5 $\pm$ 30,4	141,1 $\pm$ 26,3	125,1 $\pm$ 33,2	130,8 $\pm$ 28,5
HDL (mg/dL)	62,6 $\pm$ 16,7	52,8 $\pm$ 14,7	65,1 $\pm$ 17,6	55,4 $\pm$ 19,2
TG (mg/dL)	99,1 $\pm$ 39,5	123,6 $\pm$ 40,4	99,4 $\pm$ 49,7	120,3 $\pm$ 80,8
pro-BNP (pg/mL)	47,7 $\pm$ 18	44,7 $\pm$ 25,2	65,3 $\pm$ 48,8	38,8 $\pm$ 51,6
TnI (pg/mL)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
HS-cTnI (pg/mL)	3,32 $\pm$ 0,83	4,92 $\pm$ 1,87&&	3,67 $\pm$ 1,22	5,92 $\pm$ 2#
P.C.R.	0,16 $\pm$ 0,18	0,37 $\pm$ 0,65	0,06 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,34
Tratamento CV				
Beta-bloqueantes	0	0	1 $\pm$ (7,7)	1 $\pm$ (7,7)
iECA/ARAI	0	0	1 $\pm$ (7,7)	1 $\pm$ (7,7)
Estatinas	1 (8,3)	0	0	4 $\pm$ (30,8)
Tipo de cancro				
Ductal	10 (83,3)		11 (84,6)	
Intraductal	1 (8,3)		1 (7,7)	
Micropapilar				

Lobullilar	1 (8,3)	1 (7,7)		
Subtipo				
Luminal A	6 (50)			
Luminal B	4 (33,3)	10 (76,9)		
HER2 PURO	1 (8,3)	2 (15,4)		
Triple negativo	1 (8,3)			
HER2	2 (16,7)	8 (61,5)		
R. estrógenos	10 (83,3)	11 (84,6)		
R. proxesterona	9 (75)	9 (69,2)		
Tratamento quimioterápico (mg)	Pacientes	Media dose acumulada	Pacientes	Media dose acumulada
Taxanos	11 (91,7)	473,3 ± 148,4	11 (84,6)	565 ±351
Ac monoclonais	4 (33,3)	2138 ± 500	8 (61,5)	1154 ± 1034
Ax. alquilantes	12 (100)	2882 ± 827	12 (92,3)	2565 ± 995
Antimetabolitos	12 (100)	2882 ± 827,2	12 (92,3)	2565 ± 995
Antraciclinas	12 (100)	430,4 ± 151	12 (92,3)	409 ± 171

#### 4.1.2 Secuenciación dos microARNs presentes no plasma

Un dos obxectivos da tese é coñecer se existen diferenzas de expresión nos microARNs que están presentes no plasma e se existen diferenzas entre grupos ou durante o tratamento quimioterápico, para o que as mostras se enviaron a secuenciar ao servizo de xenómica do Centro Nacional de Investigacións Cardiovasculares (CNIC).

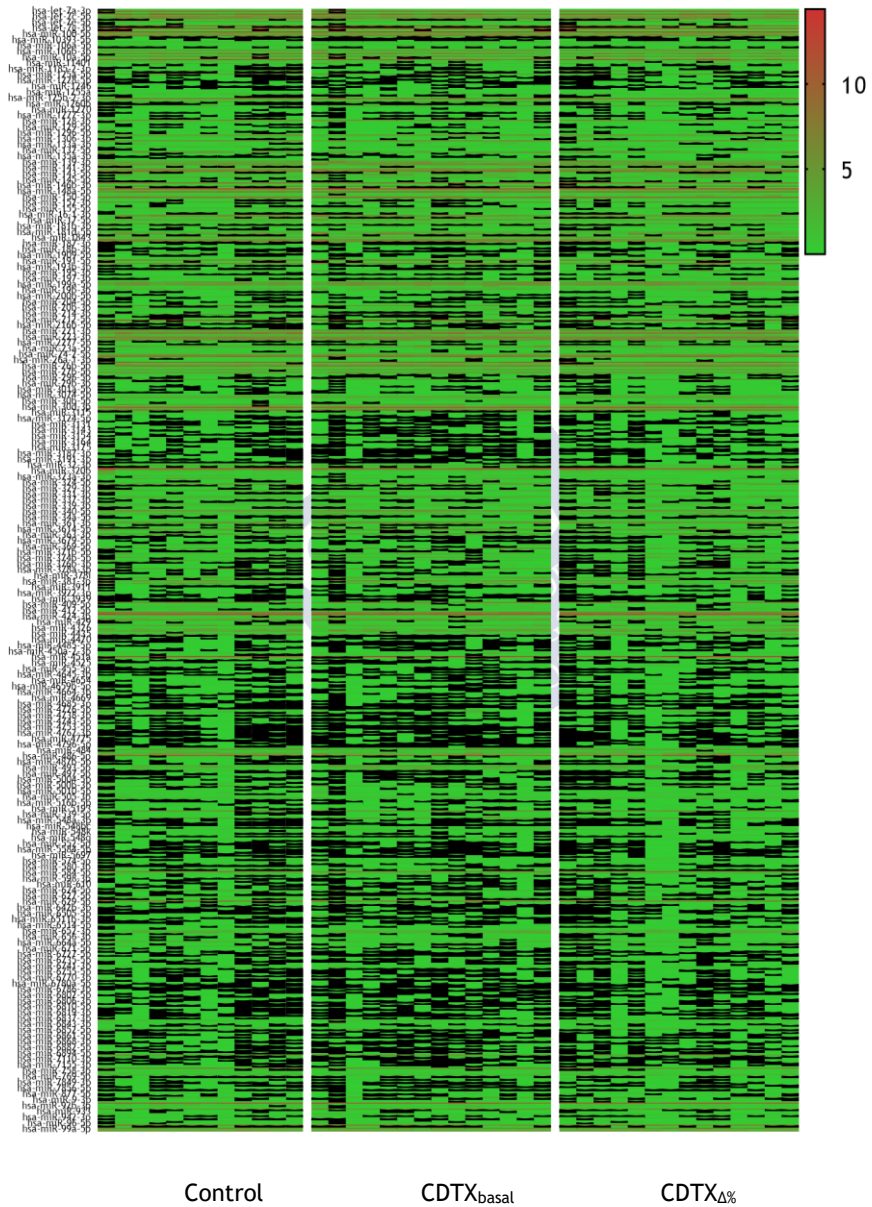


Figura 14. *HeatMap* da secuenciación dos microARNs. Datos expresados como  $\log_2$  das contaxes por lectura.

Atopáronse 771 microARNs. Os resultados mostran unha tendencia non significativa debido ao baixo número de mostras (Figura 14, anexo Táboa 18), polo que se procedeu a súa validación por RT-qPCR.

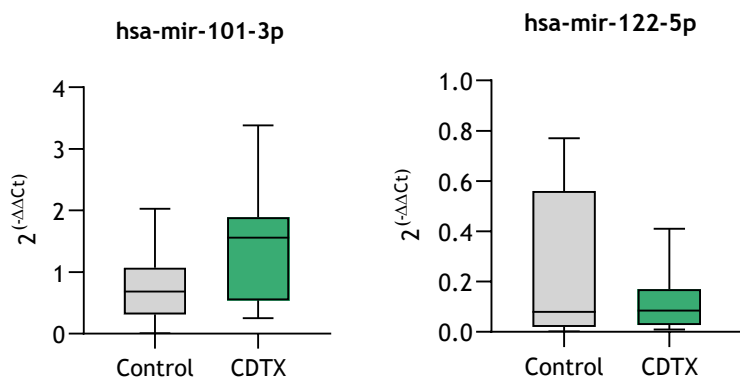
### 4.1.3 Validación por RT-qPCR dos microARNs expresados diferencialmente

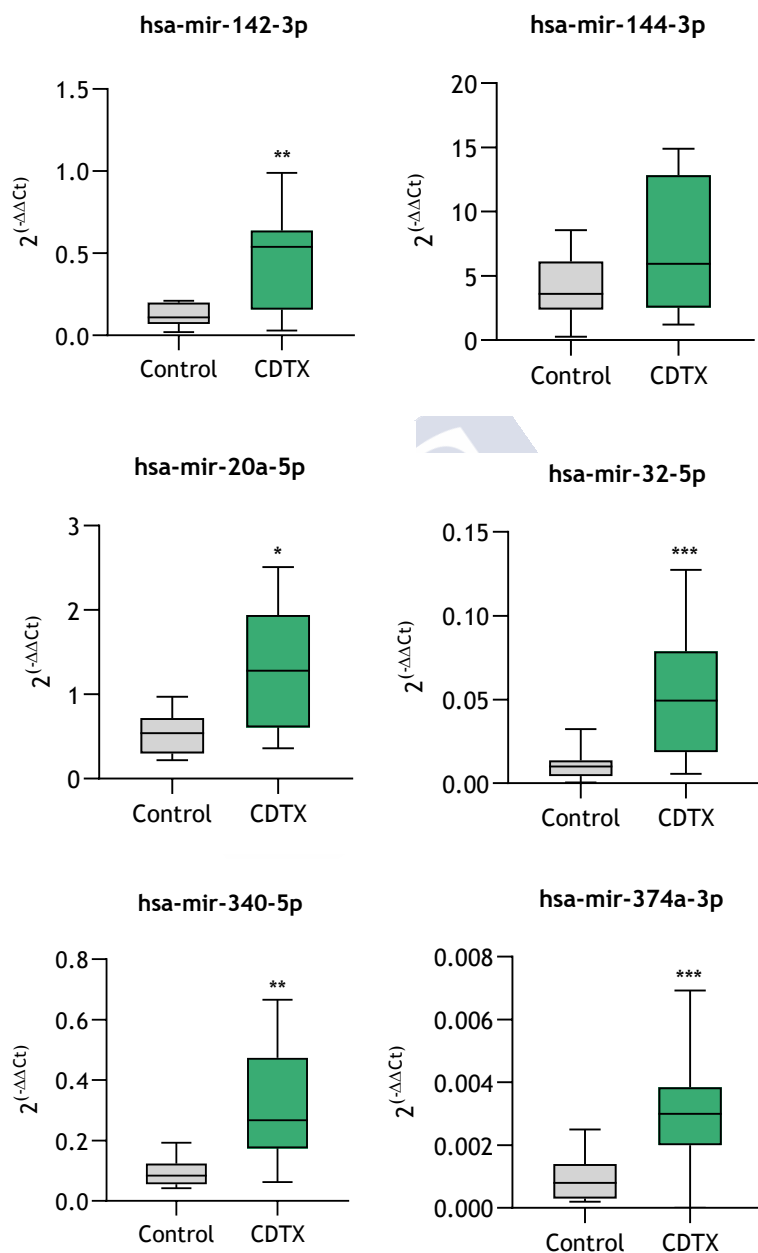
En base ás tendencias observadas no estudo de secuenciación e literatura científica, foron seleccionados unha serie de microARNs a validar mediante estudos de expresión por RT-qPCR. Os microARNs que serán sometidos esta validación son: hsa-mir-101-3p, hsa-mir-122-5p, hsa-mir-142-3p, hsa-mir-144-3p, hsa-mir-193-5p, hsa-mir-195-3p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-32-5p, hsa-mir-340-5p, hsa-mir-374a-3p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-511-5p e hsa-mir-652-3p.

#### 4.1.3.1 Diferencias de expresión previas ao tratamento quimioterápico.

Para a elaboración do estudo basal realizáronse RT-qPCR comparando os niveis de expresión dos **microARNs circulantes** entre as o grupo Control e o grupo CDTX.

En primeiro lugar analizouse se existen diferencias previas ao tratamento que poidan xustificar unha maior susceptibilidade a presentar CDTX subclínica. Neste sentido, as pacientes cunha variación do SGL mostran niveis basais significativamente máis elevados dos microARNs hsa-mir-142-3p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-32-5p, hsa-mir-340-5p, hsa-mir-374a-3p e hsa-mir-652-3p (Figura 15).





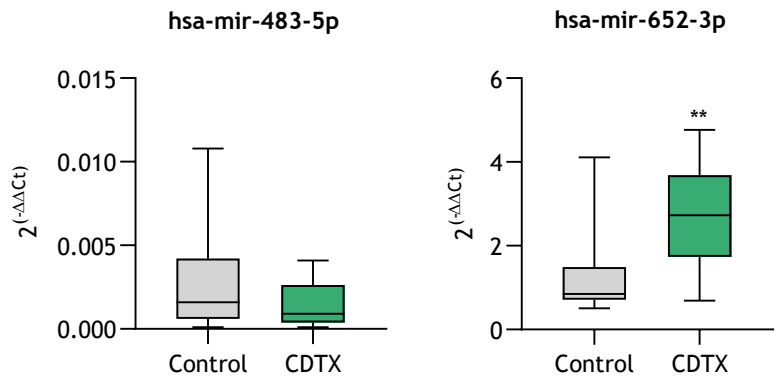
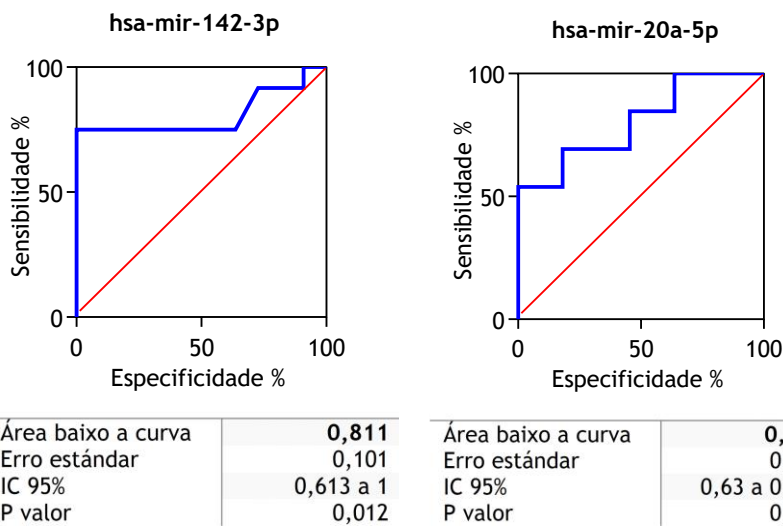
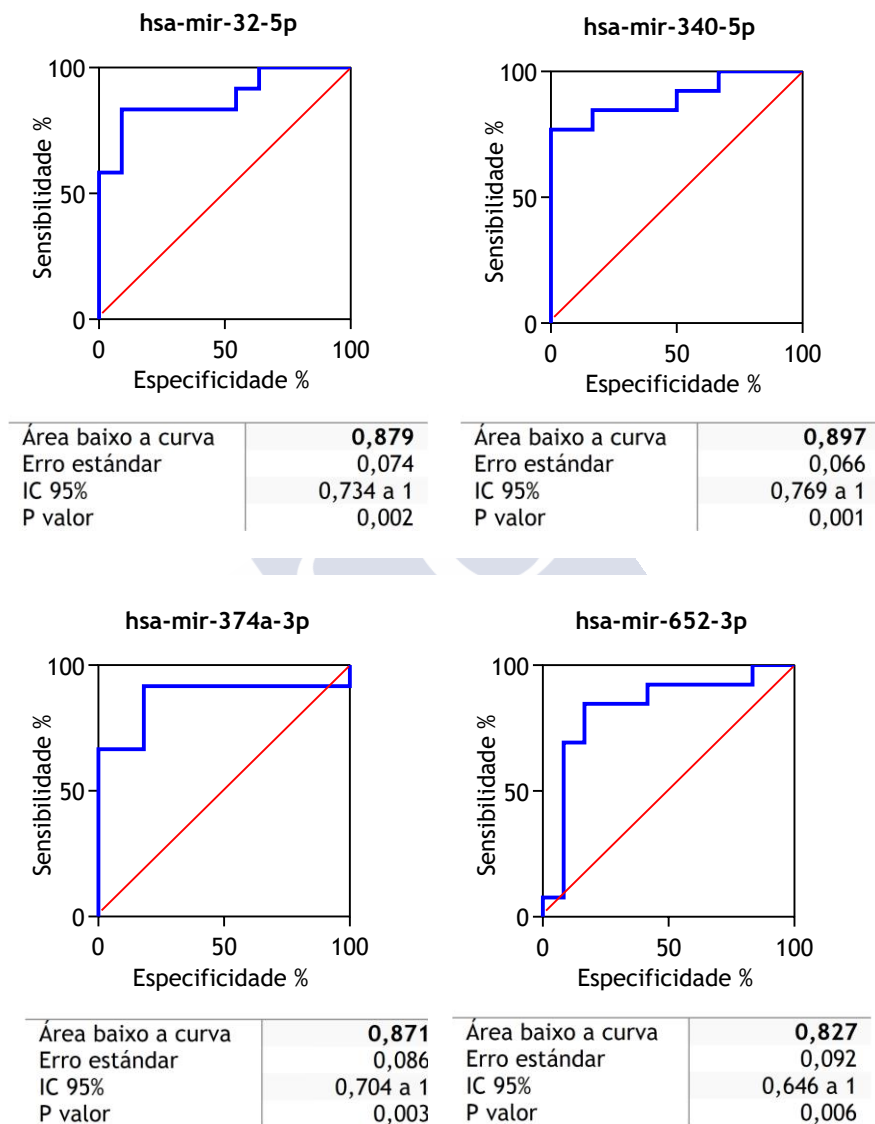


Figura 15. Expresión de microARNs en plasma antes do tratamento quimioterápico. Diagramas de caixas + mínimo a máximo, Control fronte CDTX. Significancia estatística: \*, \*\* e \*\*\* p < 0,05, 0,01 e 0,001 respectivamente fronte Control.

Os microARNs hsa-mir-142-3p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-32-5p, hsa-mir-340-5p, hsa-mir-374a-3p e hsa-mir-652-3p posúen unha área baixo a curva (*area under the curve*, AUC) de 0,811, 0,804, 0,879, 0,897, 0,871 e 0,827 respectivamente (Figura 16), indicando o seu valor predictivo.

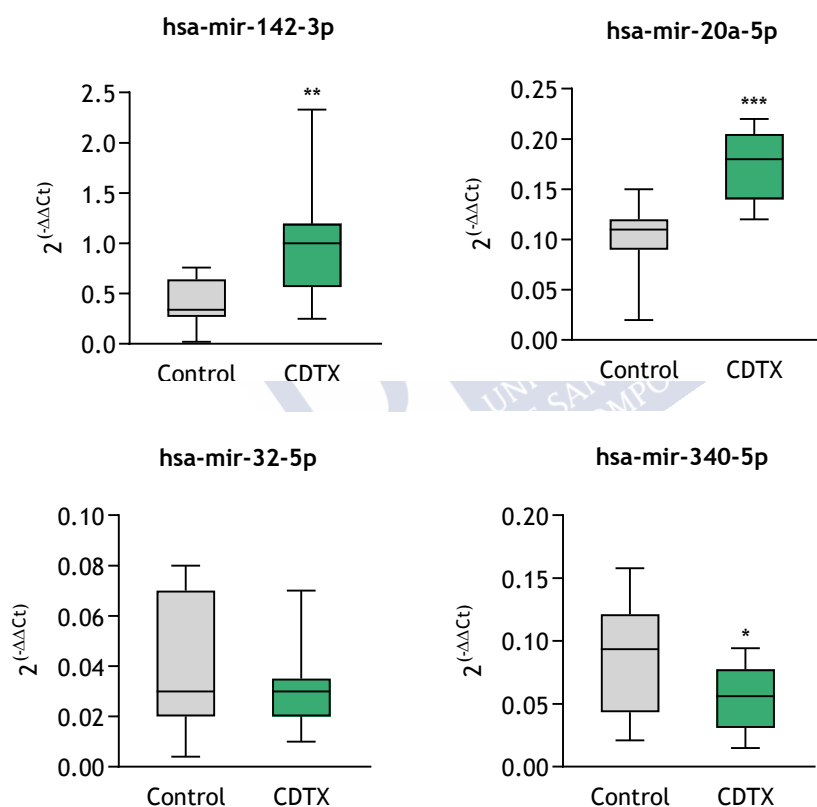






**Figura 16.** Curvas COR dos microARNs expressos diferencialmente en plasma antes do tratamento quimioterápico.

Unha vez identificados os microARNs expresados diferencialmente de maneira, realizáronse RT-qPCR en *PBMCs* en orde de estudar os niveis de expresión dos mesmos a tempo basal co fin de valorar se os niveis circulantes poden ter orixe miocárdica. Neste caso os microARNs que presentan un incremento significativo no grupo CDTX a tempo basal foron hsa-mir-142-3p, hsa-mir-20a-5p e hsa-mir-374a-3p. Pola contra, o hsa-mir-340-5p mostra unha diminución significativa no grupo CDTX (Figura 17).



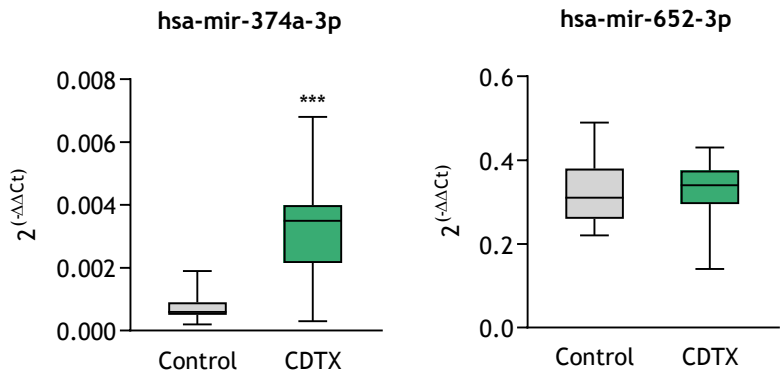
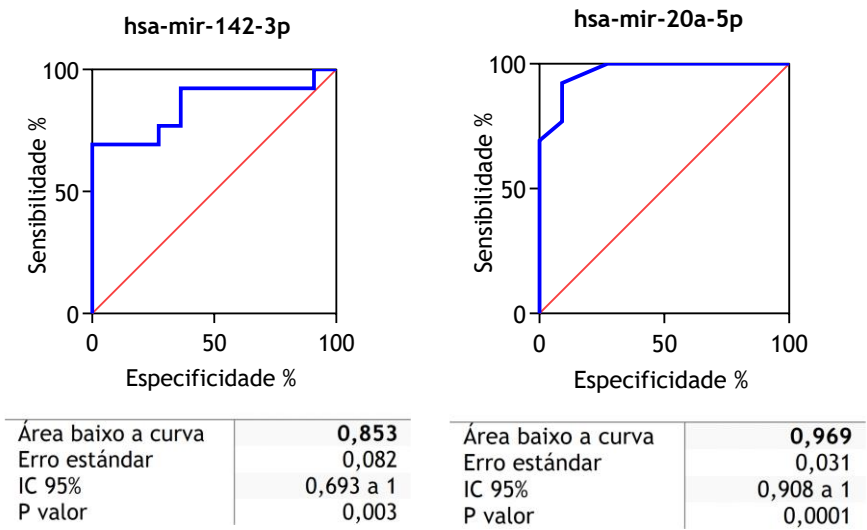


Figura 17. Expresión de microARNs en *PBMCs* antes do tratamento quimioterápico. Diagramas de caixas + mínimo a máximo, Control fronte. CDTX a nivel basal. Significancia estatística: \*, \*\* e \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $0.01$  e  $0.001$  respectivamente fronte Control.

Neste caso os microARNs hsa-mir-142-3p, hsa-mir-20a-5p e hsa-mir-374a-3p e hsa-mir-340-5p presentan unha *AUC* de 0,853, 0,969, 0,916 e 0,766 respectivamente, indicando o valor predictivo de ditos microARNs (Figura 18).



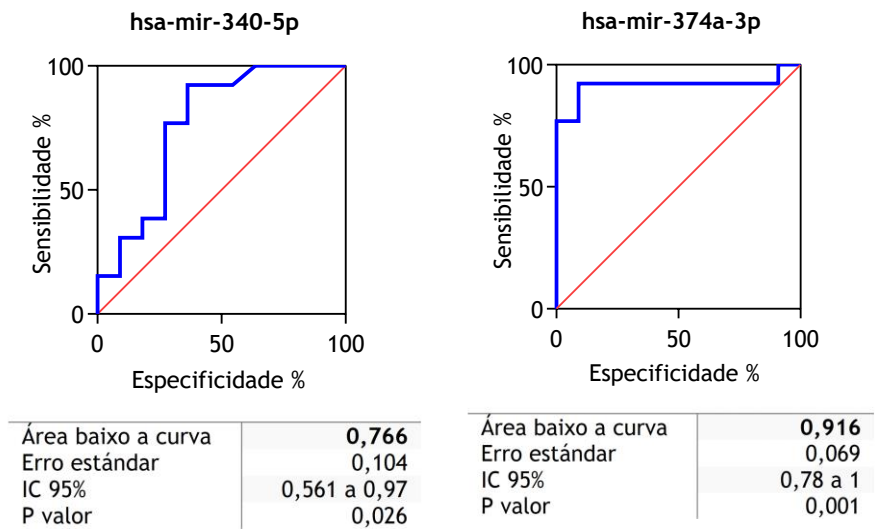


Figura 18. Curvas COR dos microARNs expresados diferencialmente en *PBMCs* antes do tratamento quimioterápico.

A continuación, móstrase a comparativa da expresión en **plasma** en *PBMCs* (Figura 19).

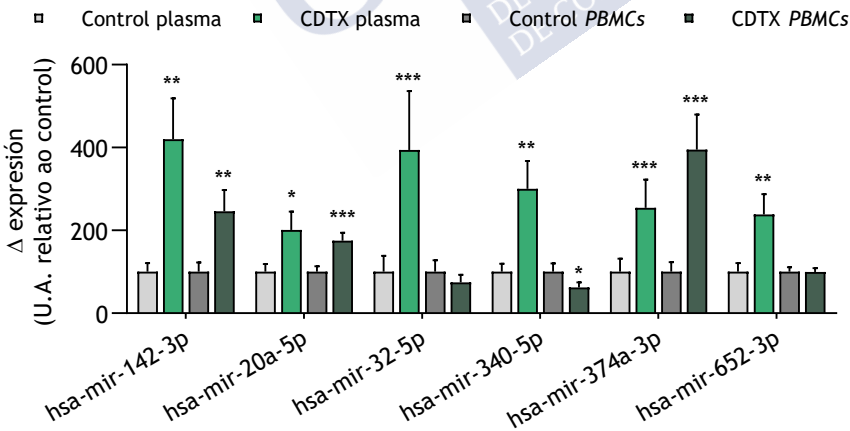
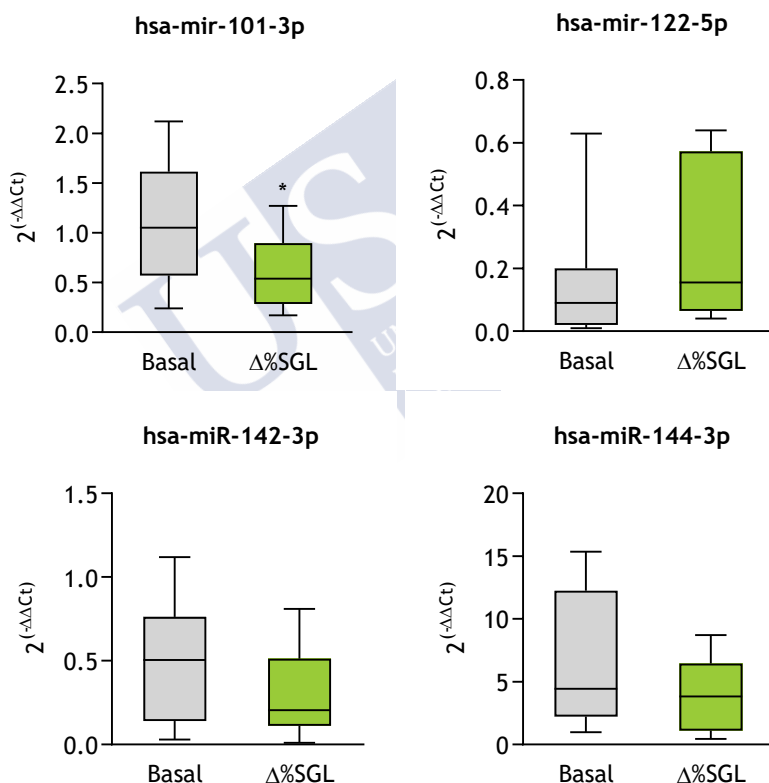


Figura 19. Patrón de expresión diferencial dos microARNs a nivel basal en plasma e *PBMCs*. Datos expresados como media + EE. Significancia estadística: \*, \*\* e \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $0.01$  e  $0.001$  respectivamente fronte Control.

#### 4.1.3.2 Cambios no perfil de expresión durante o tratamento quimioterápico.

A continuación analizouse se existen cambios no perfil circulante de microARNs ao longo do tratamento quimioterápico que poidan asociarse á aparición de signos de CDTX subclínica. Neste sentido, as pacientes cunha variación do SGL por riba do 12% mostran a súa vez unha diminución significativa na expresión de hsa-mir-101-3p, hsa-mir-340-5p e hsa-mir-652-3p (Figura 20).



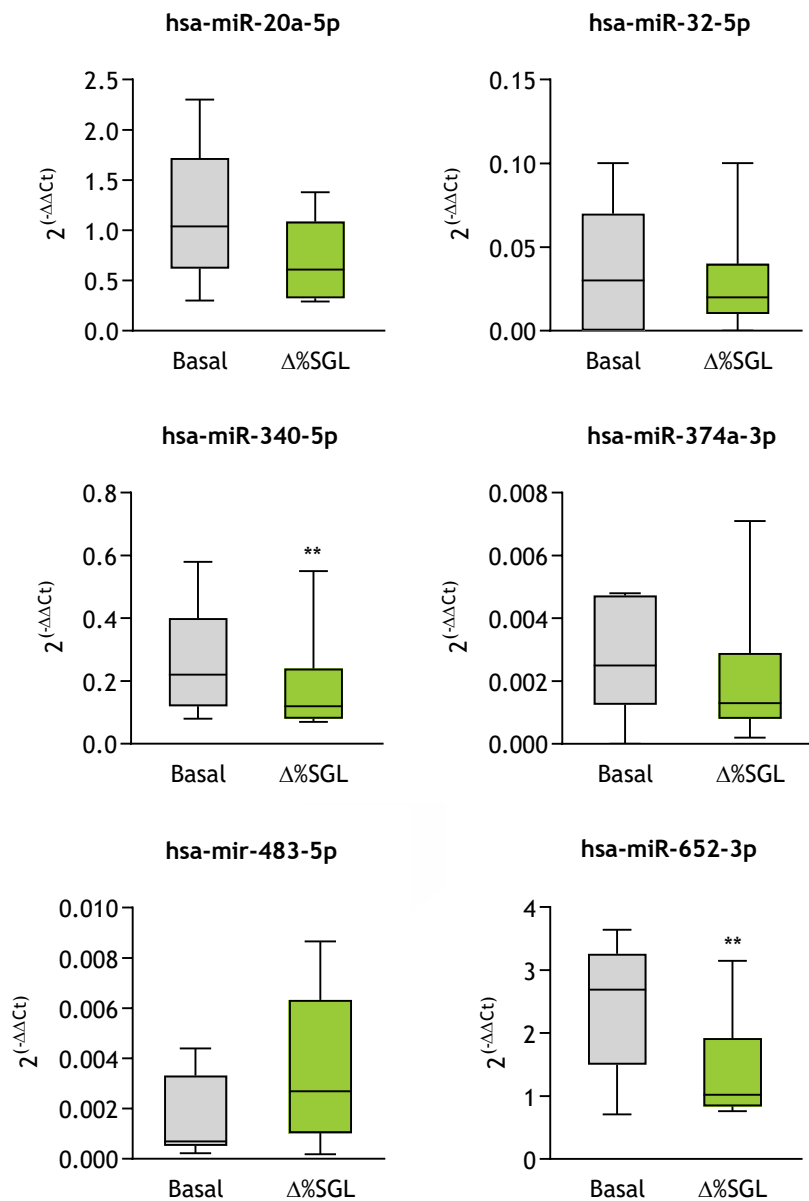


Figura 20. Expresión de microARNs en plasma en pacientes que desarrollan CDTX subclínica durante o tratamiento quimioterápico. Diagramas de caixas + mínimo a máximo, Basal frente  $\Delta\%SGL$ . Significancia estadística: \* e \*\*  $p < 0.05$  e  $0.01$  respectivamente frente Basal.

Os microARNs hsa-mir-101-3p e hsa-mir-652-3p cunha *AUC* de 0,757 e 0,806 respectivamente, indicando o seu valor diagnóstico (Figura 21).

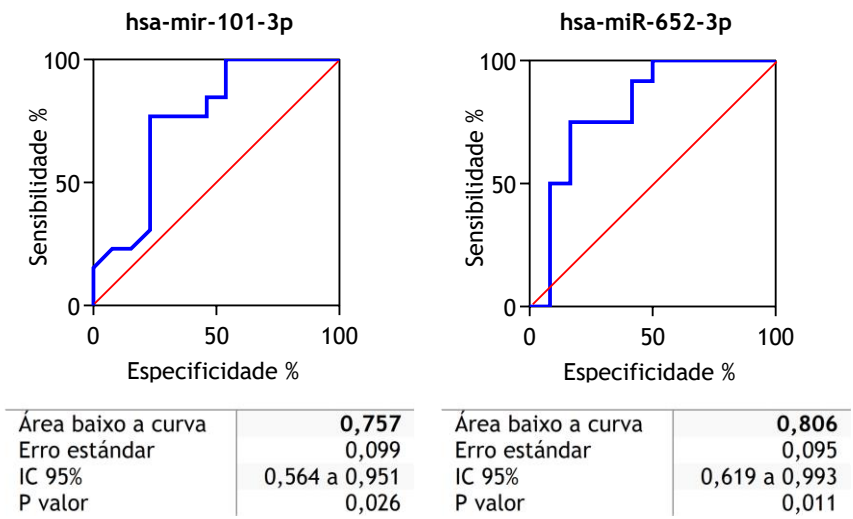


Figura 21. Curvas COR dos microARNs regulados diferencialmente en plasma en pacientes que desenvolven CDTX subclínica durante o tratamento quimioterápico

De igual maneira que coma no estudo basal, realizáronse RT-qPCR en *PBMCs* estudiando só os microARNs expresados diferencialmente de maneira significativa en plasma. O único microARN que se expresa diferencialmente a nivel lonxitudinal en *PBMCs* é o hsa-mir-652-3p, mostrando un incremento no punto ao cal existe variación da %SGL (Figura 22).

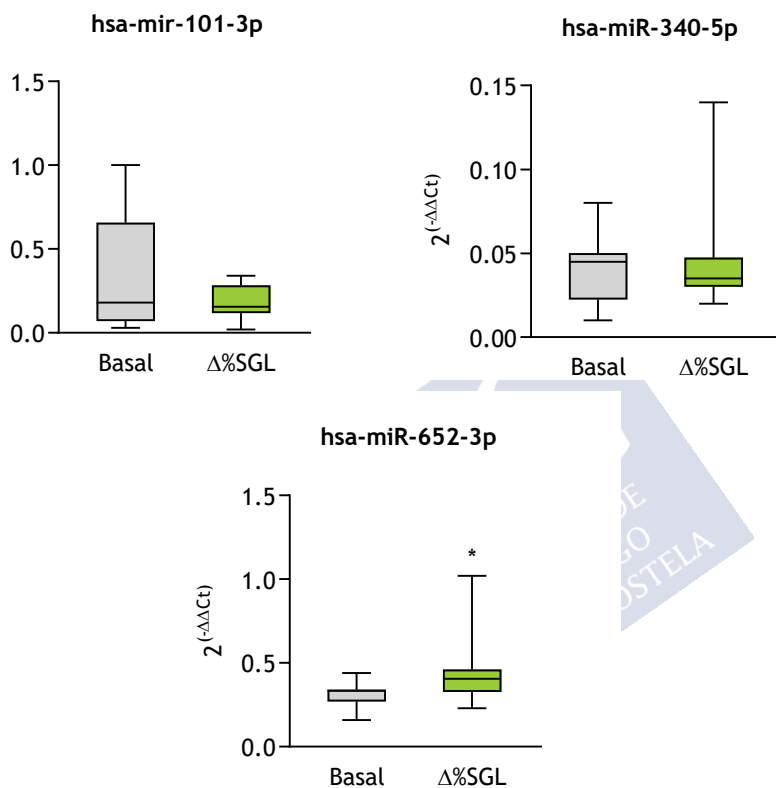
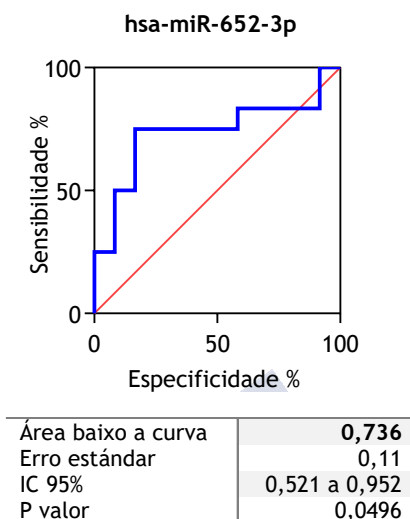


Figura 22. Expresión de microARNs en PBMCs en pacientes que desarrollan CDTX subclínica durante o tratamiento quimioterápico. Diagramas de caixas + mínimo a máximo, Basal fronte Δ%SGL. Significancia estatística: \*  $p < 0.05$  fronte Basal.

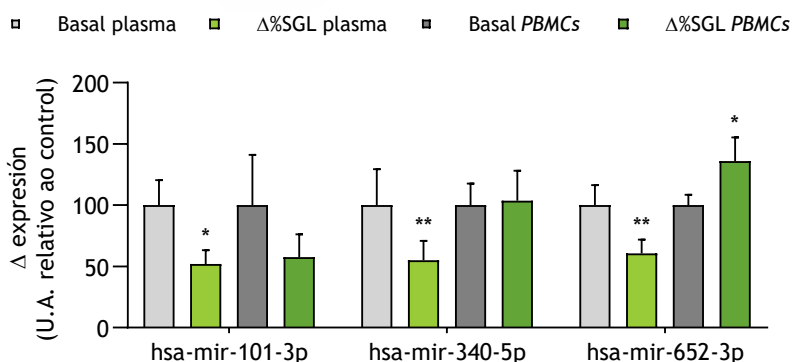


Neste caso o hsa-miR-652-3p presenta unha *AUC* de 0,736 (Figura 23).



**Figura 23.** Curvas COR do microARN regulado diferencialmente en *PBMCs* en pacientes que desenvolven CDTX subclínica durante o tratamento quimioterápico.

Na seguinte figura móstrase una comparativa da expresión dos microARNs a nivel lonxitudinal entre plasma e *PBMCs*. O hsa-mir-101-3p seguen a mesma tendencia en ambos tipos de mostra, sen embargo o hsa-mir-652-3p mostra unha tendencia contraria cando se compara entre o plasma e as *PBMCs* (Figura 24).



**Figura 24.** Patrón de expresión diferencial dos microARNs a nivel lonxitudinal en plasma e *PBMCs*. Datos expresados como media + EE. Significancia estatística: \* e \*\*  $p < 0.05$  e  $0.01$  respectivamente fronte Basal.

Co fin de descartar que os cambios observados foron debidos ao tratamento ou á evolución do paciente, realizouse paralelamente un estudo lonxitudinal no **plasma** dos controis, aquelas pacientes que non desenvolven CDTX subclínica ao longo do tratamento quimioterápico (Figura 25).

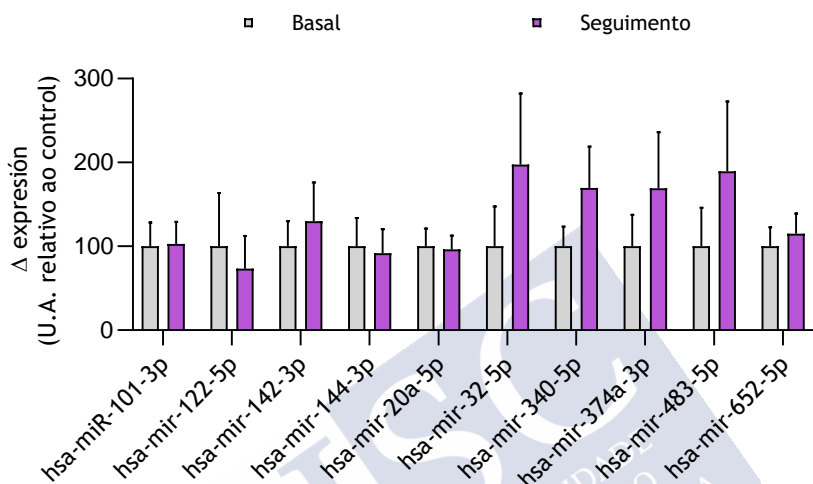


Figura 25. Padrón de expresión diferencial dos microARNs a nivel lonxitudinal en plasma das pacientes que non desenvolven CDTX subclínica. Datos expresados como media + EE, relativos ao control.

Os resultados reflexados mostran como non se atopan diferencias significativas no patrón de expresión de microARNs circulantes ao longo do tratamento quimioterápico.

#### 4.1.4 Estudo de targeting e *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA)

Mediante o emprego da ferramenta *miRWalk 2.0*, realizouse un análise *in silico* dos xenes diana (*targeting*) dos microARNs regulados diferencialmente nas distintas análises en conxunto, para coñecer que xenes e rutas poden estar alteradas pola variación de expresión dos microARNs.

#### 4.1.4.1 Estudo de predición de diana e rutas enriquecidas asociadas ás diferencias previas ao tratamento quimioterápico.

En primeiro lugar realizouse un estudo de *targeting* dos microARNs que se expresan diferencialmente no **plasma** antes do tratamento quimioterápico. A Figura 26 mostra o tamaño dos sets preditos polo *miRWalk* a nivel individual. Por outra banda, as interseccións de dous ou máis microARNs, mostran as dianas comúns aos mesmos. O hsa-mir-20a-5p é o que máis dianas aporta.

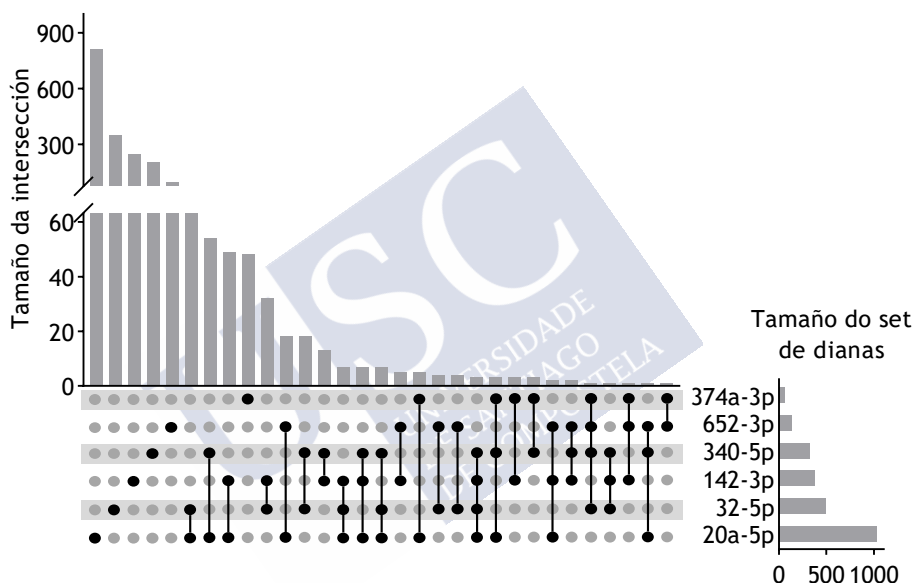


Figura 26. Tamaño dos sets (xenes diana dos microARNs) a nivel individual en combinación.

Ademais analizáronse as rutas enriquecidas coa base de datos de rutas de *KEGG* segundo as dianas resultantes do estudo de predición. A Figura 27 mostra as vías moleculares cun p valor significativo ( $< 0,05$ ) cunha potencial implicación en procesos cardiovasculares. Entre elas cabe destacar o enriquecemento na sinalización adrenérxica en cardiomiócitos e a cardiomiopatía arritmoxénica do ventrículo dereito, así como a regulación do citoesqueleto de actina e rutas de sinalización de *PI3k-Akt*, *MAPK* ou *FoxO*.

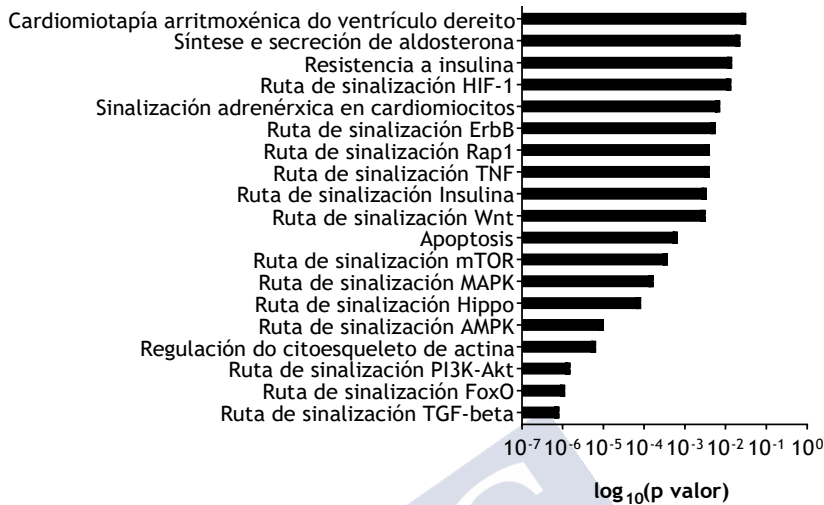


Figura 27. Estudo de *targeting* dos microARNs significativos en plasma a nivel basal. GSEA en rutas KEGG.

Realizouse a mesma análise con aqueles microARNs diferenciados significativamente en *PBMCs*. De novo é o hsa-mir-20a-5p o microARN que aporta máis dianas (Figura 28).

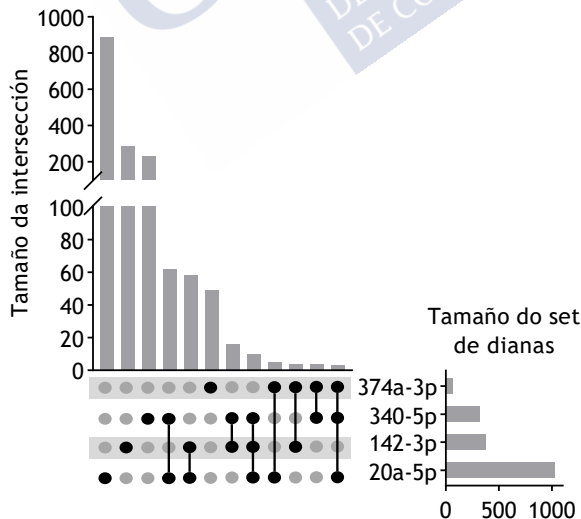


Figura 28. Tamaño dos sets (xenes diana dos microARNs) a nivel individual en combinación.

O estudo *GSEA* mostra un enriquecemento significativo en rutas de sinalización como a de *TGF $\beta$* , *PI3K-Akt* ou as *MAPKs*, así como na sinalización adrenérxica de cardiomiocitos (Figura 29).



Figura 29. Estudo de targeting dos microARNs significativos en *PBMCs* a nivel basal. *GSEA* en rutas *KEGG*.

#### 4.1.4.2 Estudo de predición de dianas e rutas enriquecidas asociadas aos cambios no perfil de expresión durante o tratamento quimioterápico

Seguidamente realizouse un *targeting* dos microARNs que se expresan diferencialmente durante o tratamento quimioterápico. Neste caso o tamaño dos sets preditos polo *miRWalk* a nivel individual móstrase equivalente entre os microARNs, sendo os que máis aportan o hsa-mir-101-5p e o hsa-mir-340-5p. As interseccións de dous ou os tres microARNs, mostran as dianas comúns aos mesmos (Figura 30).

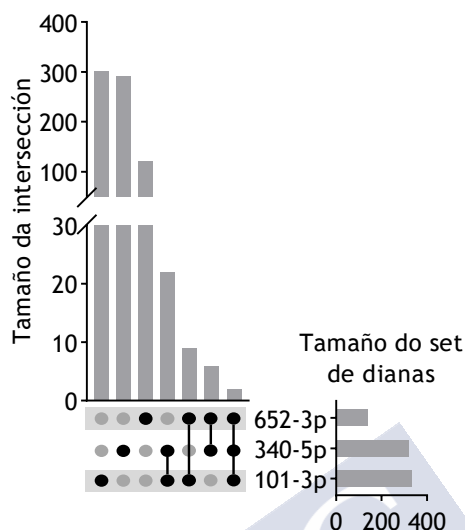


Figura 30. Tamaño dos sets (xenes diana dos microARNs) a nivel individual en combinación.

A análise de enriquecemento mostra de maneira significativa implicacións das dianas en rutas como a sinalización de adipocitokinas e apoptose. Tamén existe enriquecemento na regulación do citoesqueleto de actina e rutas de sinalización de FoxO ou MAP kinasas (Figura 31).

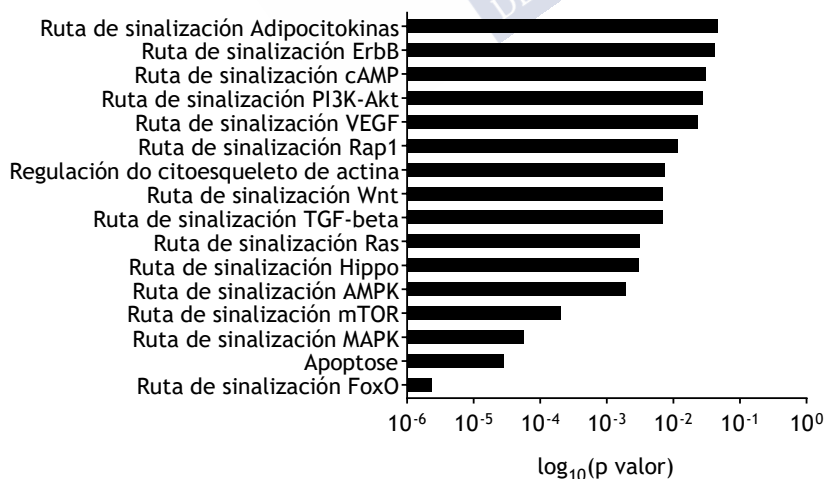


Figura 31. Estudo de *targeting* dos microARNs significativos en plasma a nivel basal. GSEA en rutas KEGG.

En canto ao estudo de *targeting* en *PBMCs* durante o tratamento, o único microARN que presenta diferencias significativas é o hsa-mir-652-3p, que posúe en torno a 300 xenes diana. Cabe destacar que neste caso a análise de enriquecemento Figura 32 mostra implicación en cardiomiopatía hipertrófica, ademais de rutas de sinalización como FoxO ou mTOR.

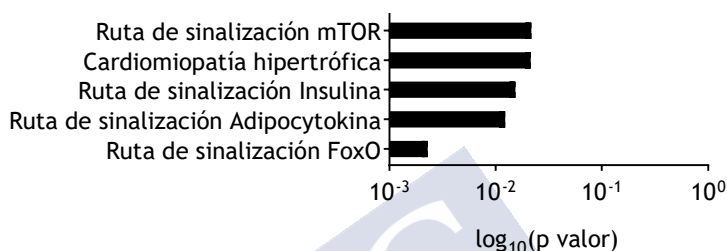


Figura 32. Estudo de *targeting* dos microARNs significativos en *PBMCs* a nivel lonxitudinal. GSEA do hsa-mir-652-3p en rutas KEGG.

#### 4.1.5 Estudo dos niveis de adipokinas das pacientes

Para coñecer se os niveis circulantes de adipokinas poden estar asociados co incremento da susceptibilidade a desenvolver CDTX, analizouse, mediante inmunoensaio, as diferencias individuais na concentración de adipokinas circulantes implicadas en patoloxía cardiovascular (omentina, adiponectina, Gal-3, *FABP4*) que poidan xustificar diferencias na susceptibilidade a presentar CDTX subclínica.

##### 4.1.5.1 Determinación de adipokinas circulantes

Analizouse se existen diferencias individuais previas e durante o tratamento quimioterápico que poidan xustificar unha maior susceptibilidade a presentar CDTX subclínica.

A **OMT** presenta unha redución significativa da concentración plasmática a nivel basal en aquelas pacientes que desenvolven CDTX subclínica ao longo do tratamento en comparación coas que non desenvolven CDTX (CDTX 489,3 ng/ml fronte Control 733 ng/ml) estas diferenzas mantéñense ao longo do tratamento (CDTX 415,1 ng/ml fronte Control 694,7 ng/ml). En canto a **AdipoQ**, a tendencia resulta oposta á OMT a nivel basal. Neste caso os niveis circulantes

atópanse significativamente incrementados no grupo CDTX (8650 pg/ml) comparados co grupo Control 5455 pg/ml. En canto aos niveis circulantes de Gal3 os niveis circulantes de Gal3 atópanse significativamente diminuídos no Control do seguimento (2,97 pg/ml) fronte ao Control a nivel basal (5,59 pg/ml). Non se atoparon diferencias significativas nos niveis de *FABP4* (Figura 33).

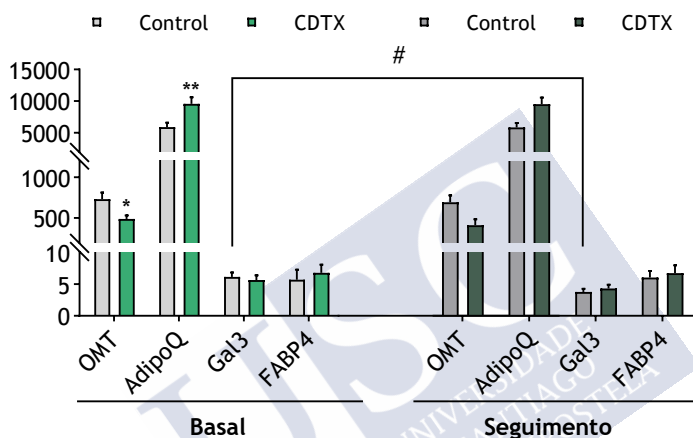


Figura 33. Niveis de adipocinas circulantes nivel basal. OMT ng/ml; AdipoQ, Gal3 e FABP4 pg/ml. Datos representados como media + EE. Significancia estatística: \* < 0,05, \*\* < 0,01 e # < 0,05 Control basal.

#### 4.1.5.2 Correlación das adipocinas cos parámetros ecocardiográficos de CDTX subclínica.

Unha vez obtidos os resultados das análises das adipocinas, estudouse a correlación daquelas que presentan diferencias significativas coa variación da porcentaxe de SGL do grupo I/II. No caso da OMT obsérvase unha correlación negativa coa variación da %SGL, cunha  $r$  de -0,448 e un  $p$  valor de 0,017 (Figura 34), suxerindo que existe unha relación inversamente proporcional entre a concentración de OMT e a variación do SGL de maneira significativa.



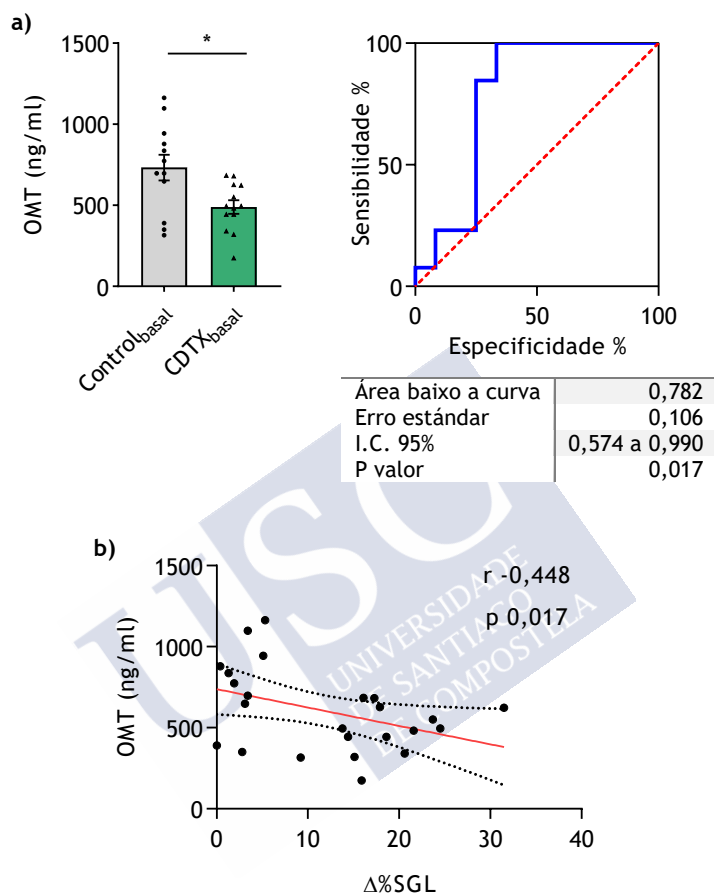


Figura 34. Curva COR e correlación da OMT coa variación da %SGL. a) Histograma resumo das diferenzas significativas de OMT e curva COR. b) *Plot* da correlación con  $\Delta\%SGL$  con OMT. Datos representados como media  $\pm$  EE e *dots* da medida por individuo e recta de regresión con liñas de erro. Significancia estatística: \* < 0,05 Control basal fronte CDTX basal.

En canto a AdipoQ, obsérvase unha correlación positiva coa variación da %SGL, cunha  $r$  de 0,407 e un  $p$  valor de 0,028, suxerindo que a concentración de AdipoQ é directamente proporcional á variación do SGL (Figura 35).

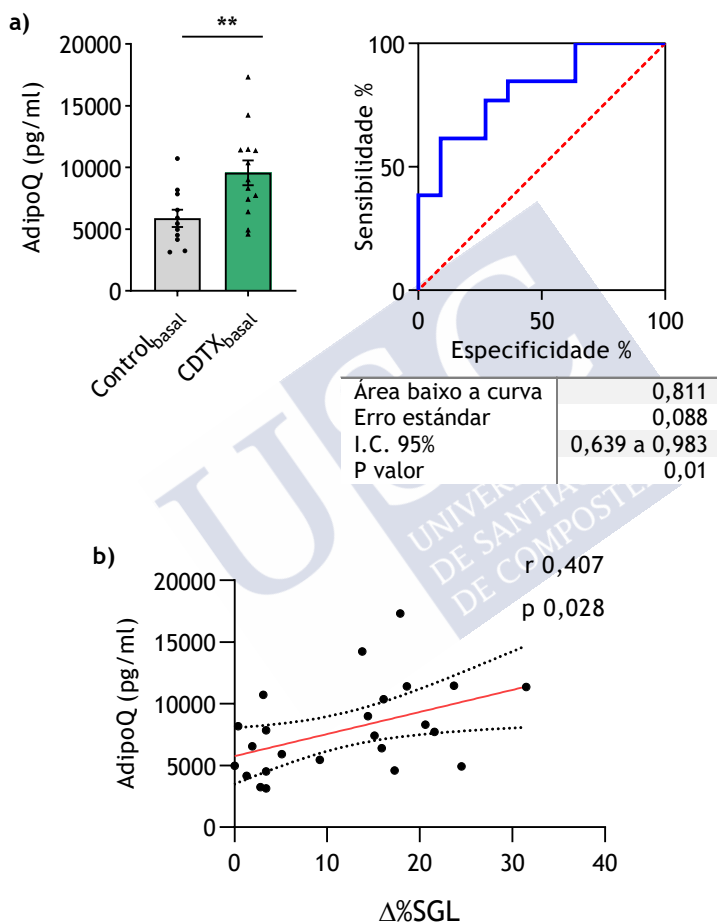


Figura 35. Curva COR e correlación da AdipoQ coa variación da %SGL.  
a) Histograma resumo das diferenzas significativas de AdipoQ e curva COR.  
b) Plot da correlación con  $\Delta\%$ SGL con AdipoQ. Datos representados como media  $\pm$  EE e dots da medida por individuo e recta de regresión con liñas de erro. Significancia estatística: \*\* < 0,01 Control basal fronte CDTX basal.

As diferencias lonxitudinais de Gal3 circulante que se atopan no Grupo control non presentan correlación coa variación da %SGL (Figura 36).

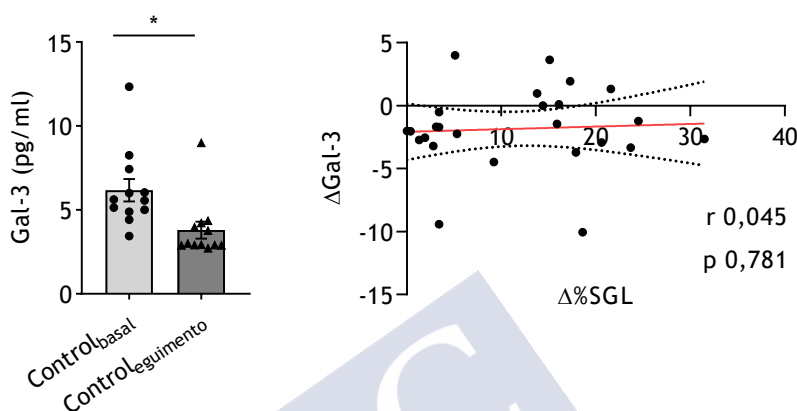


Figura 36. Correlación de Gal3 coa variación da %SGL a)Histograma resumo das diferencias significativas de Gal3. b)Plot da correlación con  $\Delta\%$ SGL con Gal3. Datos representados como media  $\pm$  EE e dots da medida por individuo e recta de regresión con liñas de erro. Significancia estatística: \* < 0,05 Control basal fronte CDTX basal.

#### 4.1.5.3 Correlación das adipokinas cos microARNs expresados diferencialmente en plasma.

Á súa vez, estudiáronse as posibles correlacións entre os niveis de adipokinas e de microARNs circulantes. Obtívose unha correlación negativa significativa entre a OMT e o hsa-mir-142-3p, cunha  $r$  de -0,463 e un  $p$  valor de 0,017, e co hsa-mir-652-3p cunha  $r$  de -0,469 e un  $p$  valor de 0,018 (Figura 37). Ambos microARNs están correlacionados coa diminución dos niveis de OMT.

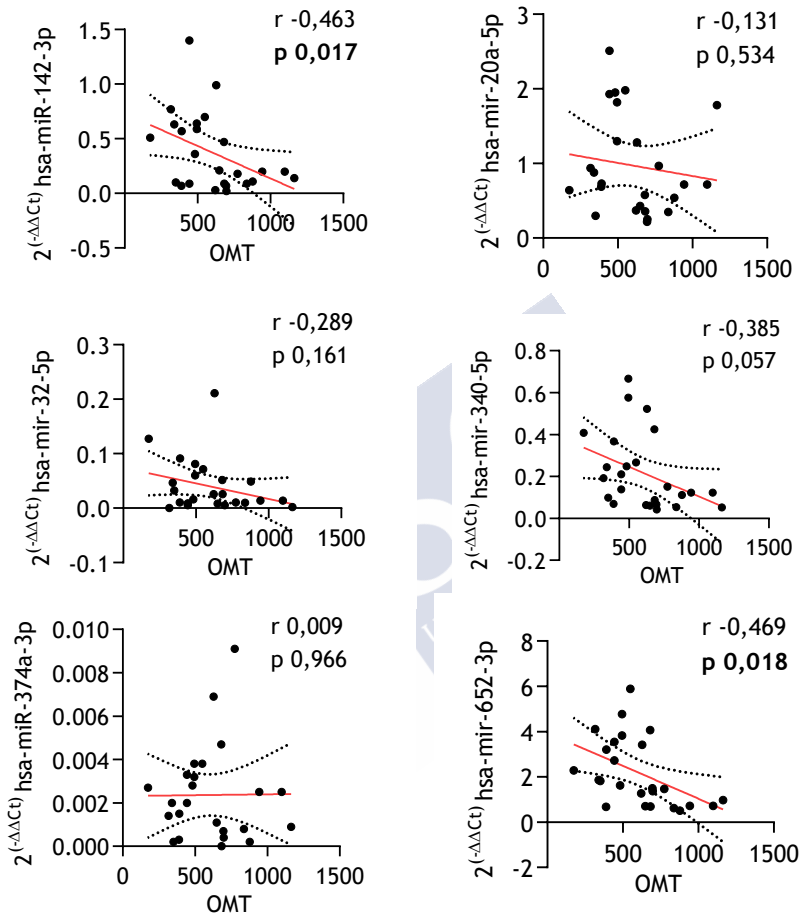


Figura 37. Correlación da OMT cos microARNs. Datos representados como *dots* da medida por individuo e recta de regresión con liñas de erro.

Sen embargo, con relación a AdipoQ, non se atoparon correlacións significativas cos microARNs circulantes (Figura 38).

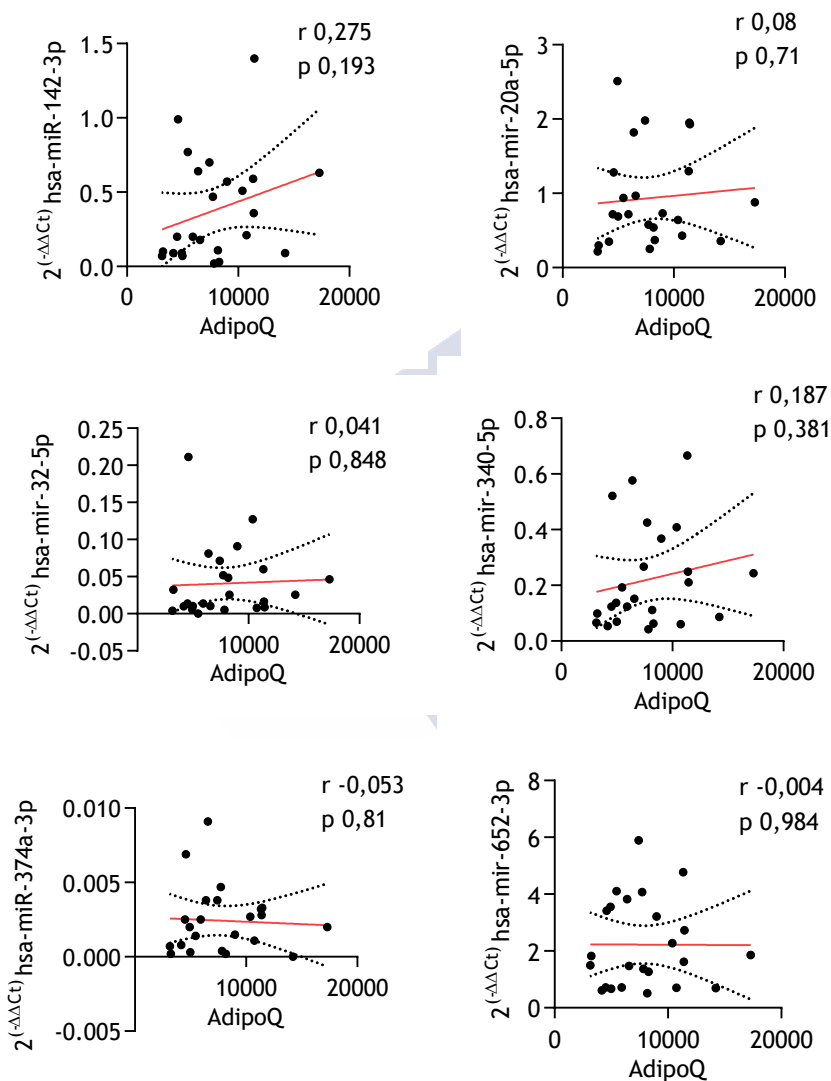


Figura 38. Correlación da AdipoQ cos microARNs. Datos representados como *dots* da medida por individuo e recta de regresión con liñas de erro.

En canto a Gal3, non se atoparon correlacións significativas cos microARNs circulantes (Figura 39).

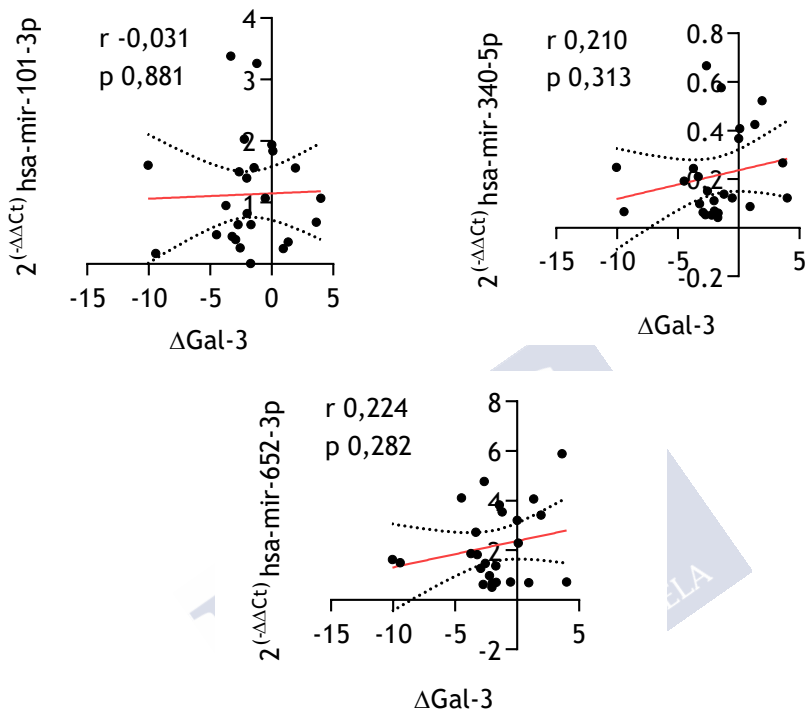


Figura 39. Correlación da Gal3 cos microARNs. Datos representados como *dots* da medida por individuo e recta de regresión con liñas de erro.

## 4.2 PROTECCIÓN DA OMT EN CÉLULAS H9c2 TRATADAS CON DTX

Ata o momento, os datos analizados mostran unha clara relación entre os niveis basais de OMT e a redución da porcentaxe de SGL ao longo do tratamento. Estudos previos estableceron o papel cardioprotector da OMT fronte a DOX<sup>172</sup>. Se ben as pacientes do presente estudo son tratadas con antraciclinas, quíxose valorar se a OMT xoga algún papel cardioprotector fronte ao dano producido por taxanos, xa que o DTX habitualmente está presente no esquema de tratamento das pacientes de cancro de mama.

### 4.2.1 Efectos do DTX na viabilidade de H9c2

Co fin de determinar o efecto do DTX na viabilidade dos cardiomiocitos, realizouse un estudo dose-resposta. Os resultados mostran que o DTX diminúe a viabilidade celular das H9c2 en maneira dose-dependente a concentracións superiores a 5 nM (Figura 40). Segundo os resultados obtidos, determinouse que a dose de 25 nM, cunha diminución da viabilidade dun 25-30%, como concentración cardiotóxica para posteriores estudos.

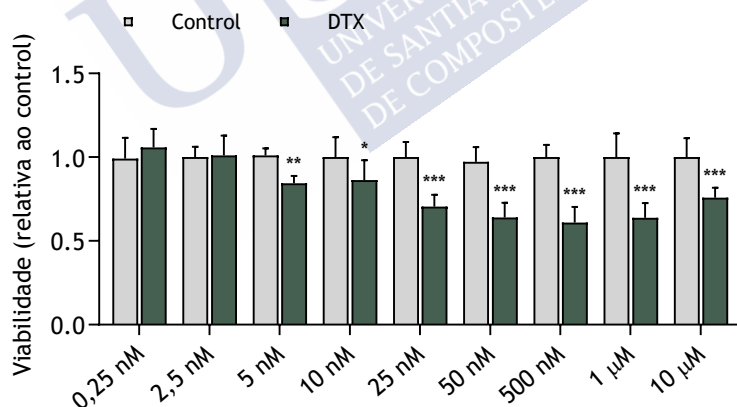


Figura 40. Dose-resposta do DTX en células H9c2. Datos expresados como media + EE. Significancia estatística \*, \*\* e \*\*\*  $p < 0,05$ ,  $0,01$ . e  $0,001$  fronte Control.

#### 4.2.2 Efectos do cotratamento OMT-DTX na viabilidade en H9c2

Co fin de determinar se a OMT desenvolve algún papel fronte a diminución da viabilidade inducida polo DTX, levouse a cabo un estudo de cotratamento. A OMT é capaz de contrarrestar o descenso de viabilidade inducido por DTX nun 56% (Figura 41).

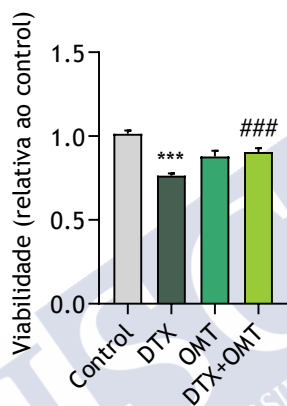


Figura 41. Efecto de DTX e OMT na apoptose. Datos expresados como media + EE de. Significancia estatística \*\*\*  $p < 0,001$  fronte Control; ###  $p < 0,001$  DTX+OMT fronte DTX.

#### 4.2.3 Efectos do DTX e OMT na apoptose en H9c2

Tendo en conta que o ensaio MTT só permite unha determinación indirecta da viabilidade, procedeuse a valorar se o incremento na mesma nas células tratadas con OMT viña asociado a un efecto antiapoptótico.



Con este fin realizouse un ensaio de apoptose por citometría de fluxo con anexina V e ioduro de propidio. Cando as células son tratadas con DTX a porcentaxe de células necróticas, incrementábase nun 8,8%, así como a porcentaxe de células apoptóticas (5,6%). Con respecto aos cotratamentos con OMT e DTX, a porcentaxe de células necróticas en comparación co tratamento co DTX diminúe nun 4%, así como a porcentaxe de células apoptóticas (4,6%) (Figura 42).

#### 4.2.4 Efecto da OMT e o DTX na activación da caspasa-3

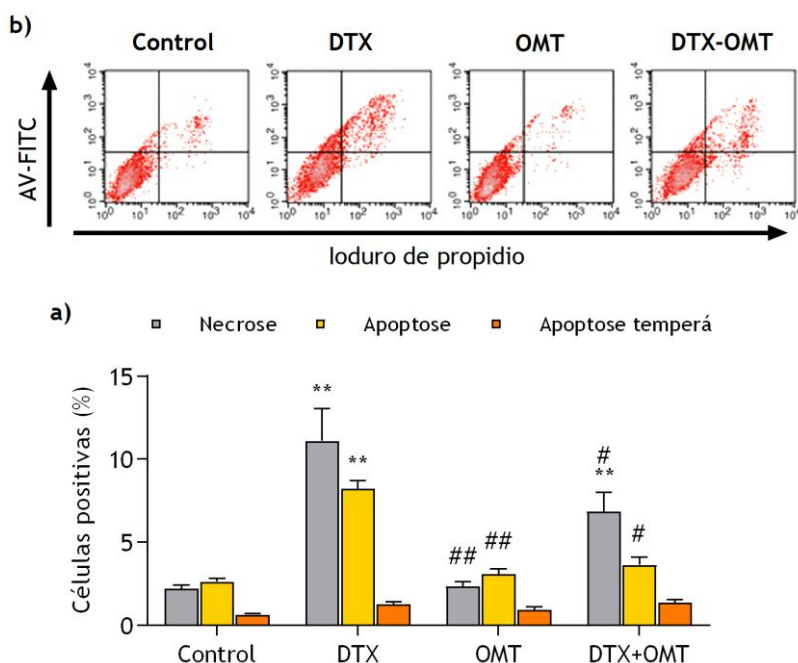


Figura 42. Efecto do DCT e OMT na apoptose. a) Plot de densidade representativo da citometría de fluxo con dobre marcaxe con Anexina V-FITC/IP. b) Ensaio de citometría de fluxo de Anexina-V/IP en células H9c2 tratadas con DTX e/ou OMT. Significancia estatística \*\*  $p < 0,01$  fronte control; #, ##  $p < 0,05$  e  $0,01$  DTX-OMT fronte DTX.

Sendo caspasa-3 un dos principais efectores finais da apoptose celular, quíxose valorar se a súa activación está relacionada coa apoptose producida por DTX.

As H9c2 foron tratadas con DTX e/ou OMT durante 24 horas, e os niveis de caspasa-3 foron analizados por *Western Blot*. Como mostra a Figura 43 a OMT contrarresta a activación de caspasa-3 inducida por DTX. O DTX incrementa 4 veces a expresión de caspasa-3 comparando co control, mentres o tratamento con OMT consegue contrarrestar este aumento ata case os niveis control (DTX  $4,97 \pm 1,37$ , fronte DTX-OMT  $1,91 \pm 0,44$ ).

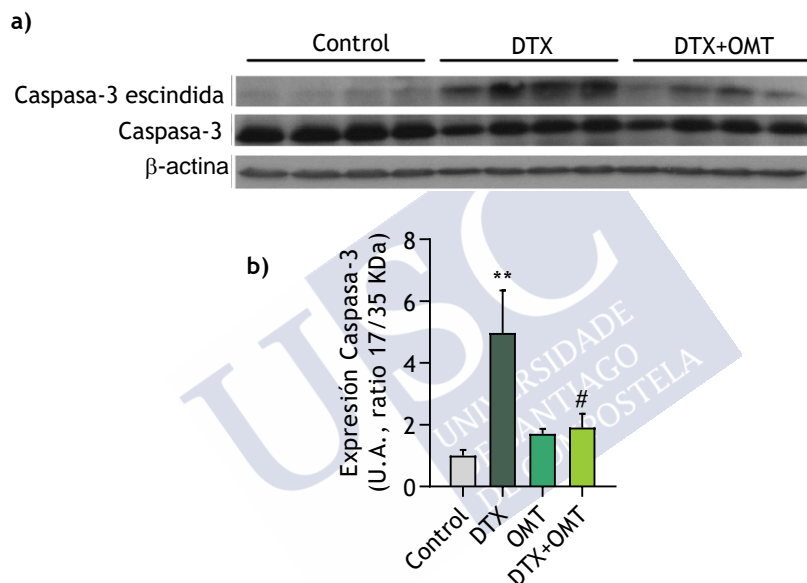


Figura 43. Niveis de caspasa-3 en células H9c2 tratadas con DTX e/ou OMT. a) Imaxe autorradiográfica representativa do Western Blot. b) Datos expresados como media + EE. Significancia estatística \*\*  $p < 0,01$  fronte control; #  $p < 0,05$  DTX-OMT fronte DTX.

#### 4.2.5 Efectos da OMT na produción de EROs inducida por DTX

En orde de coñecer os mecanismos moleculares polos cales o DTX está provocando a morte celular das H9c2, estudouse a concentración de estrés oxidativo por parte de especies reactivas de osíxeno (EROs) despois do tratamento.

Foron medidos os niveis de EROs intracelular en células, H9c2 tratadas con OMT e/ou DTX e pretratadas con NAC, un composto antioxidante, mediante DHE por citometría de fluxo.

Mentres a suplementación con NAC en células tratadas con DTX reduce os niveis de EROs significativamente (NAC-DTX  $6,64 \pm 0,42$  fronte DTX  $8,82 \pm 0,64$ ), a OMT non consegue diminuír a produción de EROs en células tratadas con DTX (DTX  $8,81 \pm 0,64$ , fronte DTX-OMT;  $8,53 \pm 1,60$ ) (Figura 44).

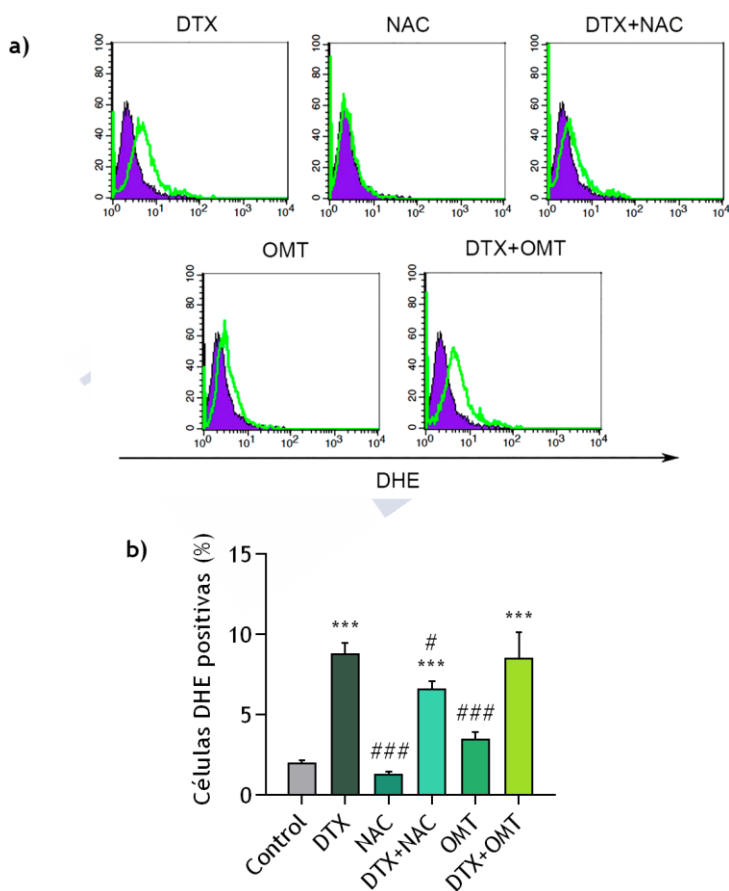


Figura 44. Efectos da OMT e/ou DTX na produción de EROs. a) *Plot* representativo de imaxes da tinguadura con DHE. b) Datos expresados como media  $\pm$  EE de 3 experimentos independentes. Significancia estatística \*\*\*  $p < 0,001$  fronte control; #, ###  $p < 0,05$  e  $0,001$  DTX-OMT fronte DTX.

#### 4.2.5.1 Expresión xénica e proteica de enzimas antioxidantes

Ademais, foi determinada a expresión de enzimas antioxidantes para avaliar se o DTX está alterando a mesma a nivel xénico e proteico.

Atendendo á expresión xénica, atópanse diferenzas significativas cando as células H9c2 foron tratadas con DTX, o cal incrementa a expresión da GPx nun 60%, e a da CAT nun 48%, pero non na SOD. O cotratamento con OMT non resulta nunha diminución significativa estes incrementos de GPx e CAT (Figura 45). En canto á expresión proteica, só presenta diferenzas significativas a SOD nas células tratadas con DTX (Figura 46).

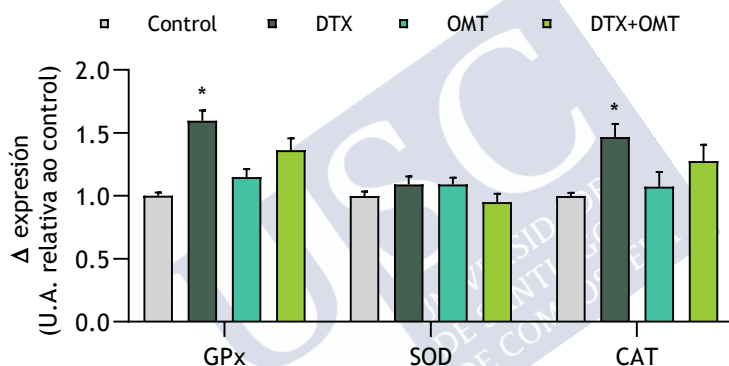


Figura 45. Expresión xénica de enzimas antioxidantes. Datos expresados como media + EE. Significancia estatística \* < p 0,05 fronte Control.

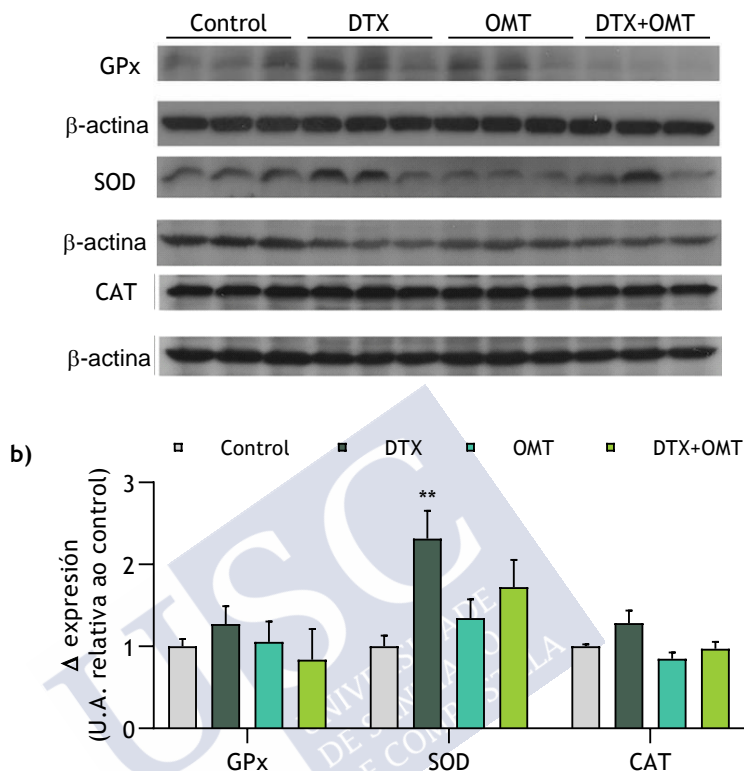


Figura 46. Expresión xénica de enzimas antioxidantes. a) Imaxe autorradiográfica representativa do *Western Blot*. b) Datos expresados como media + EE. Significancia estatística \*\* < p 0,01 fronte Control.

#### 4.2.5.1 Expresión de NADPH oxidasas

Dado que existen datos previos que mostraron un incremento da formación de EROs en células endoteliais a través de NOX4 provocada por DTX<sup>255</sup>, estudouse a súa expresión xénica en H9c2.

Os resultados de RT-qPCR mostran que non existen diferenzas de expresión xénica no tratamento con DTX con respecto ao control. Pola contra, o cotratamento con OMT mostra unha diminución significativa da expresión de NOX4. Examinouse tamén a expresión das isoformas 1 e 2 da NOX, pero non se atoparon diferenzas significativas (Figura 47).

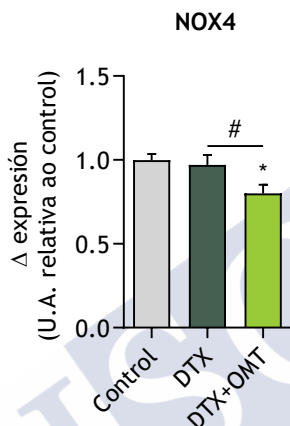


Figura 47. Efecto da OMT e/ou DTX na expresión de NOX4. Datos expresados como media  $\pm$  EE de 3 experimentos independentes. Significancia estatística \*  $p < 0,05$  fronte control e #  $p < 0,05$  DTX-OMT

#### 4.2.6 Efectos da OMT e o DTX no ERE

Dado que o ERE é un dos posibles mecanismos de toxicidade cardíaca e que podería estar explicando o aumento da viabilidade nas células tratadas con OMT e DTX, realizouse un estudo de expresión xénica e proteica das principais proteínas implicadas no mesmo.

Os resultados mostran na (Figura 48) como o DTX é capaz de diminuír a expresión xénica de BiP nun 26%, á vez que incrementa a expresión de ATF6 e CHOP nun 33% e nun 26,5% respectivamente. A OMT consegue contrarrestar a alteración da expresión xénica por parte do DTX en BiP, Atf6 e CHOP, devolvéndooas a niveis equivalentes ao control. Con respecto a GADD34, XBP1 e MCP1P nin DTX nin OMT provocan diferenzas significativas na súa expresión, excepto en GADD34, que nas células tratadas con DTX e OMT a súa expresión.

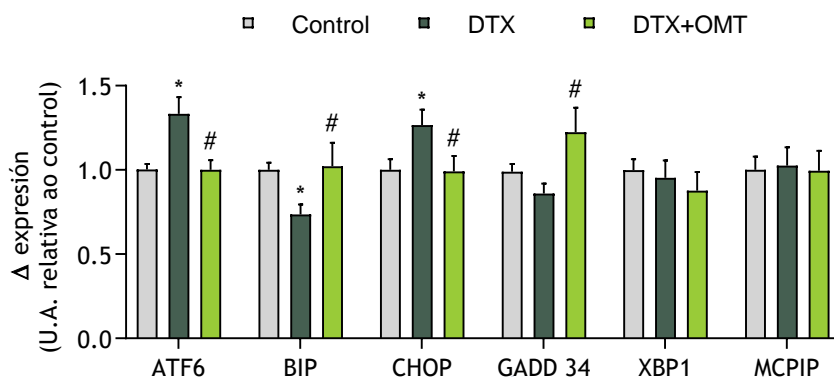


Figura 48. Expresión xénica de proteínas RE. Datos expresados como media + EE. Significancia estatística \* < p 0,05 fronte control; # < 0,05 fronte DTX.

Atendendo á expresión proteica, a (Figura 49) mostra como o DTX incrementa a expresión das proteínas estudadas: Atf6 nun 41%, p~eIF2 $\alpha$  nun 51% e BiP nun 34% con respecto ao control. A OMT, en cotratamento co DTX é capaz de reducir a expresión das proteínas por debaixo dos niveis control.

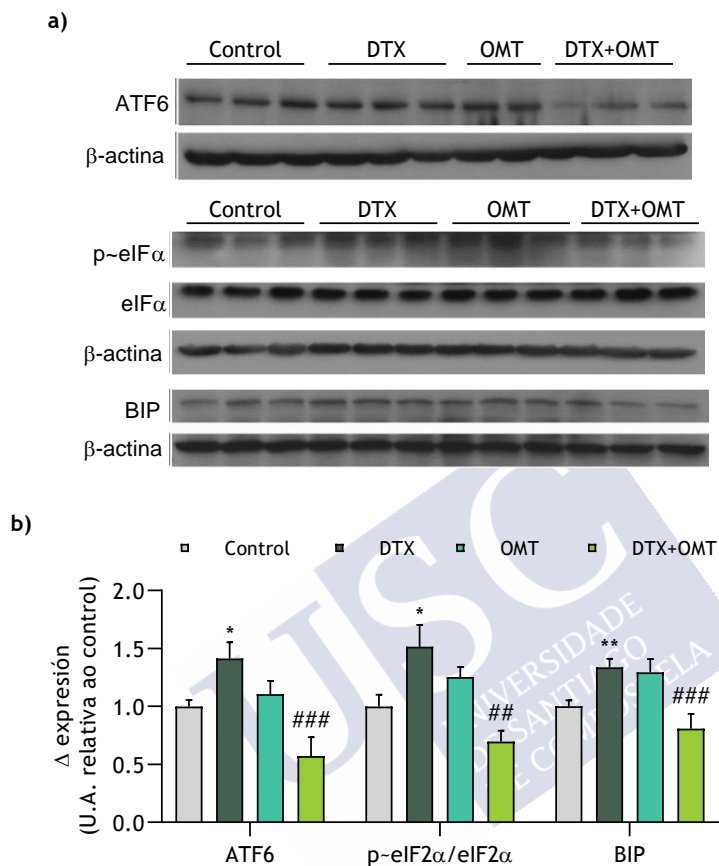


Figura 49. Expresión proteica do RE. a) Imaxe autorradiográfica representativa do Western Blot. b) Datos expresados como media + EE. Significancia estatística \* < p 0,05 fronte control; ## e ### p < 0,01 e 0,01 fronte DTX.





# DISCUSIÓN





## 5 DISCUSIÓN

---

Os avances no cribado, diagnóstico precoz e tratamento do cancro melloraron tanto a supervivencia coma a calidade de vida das pacientes de cancro de mama. Sen embargo, isto puxo de manifesto os efectos adversos que o tratamento antitumoral exerce sobre o sistema cardiovascular. A toxicidade cardíaca é a segunda causa de morbilidade e mortalidade nos sobreviventes de cancro de mama<sup>10,256</sup>. Os estudos levados a cabo en relación coa toxicidade CV asociado ao uso das antraciclinas, un dos grupos de fármacos antitumorais máis amplamente usados, deu a coñecer que esta pode resultar nunha limitación na escolla do esquema terapéutico máis axeitado<sup>256,257</sup>. Establécese polo tanto un equilibrio risco-beneficio, no que resulta clave prever ou minimizar o risco cardiovascular sen diminuír a eficacia do tratamento antitumoral.

A Cardio-Oncoloxía tenta, de xeito individualizado, predicir e minimizar a interrupción do tratamento oncolóxico e os seus efectos adversos na función cardíaca<sup>258</sup>. A experiencia clínica indica que unha adecuada estratificación do risco e a monitorización estreita do paciente ten unha certa capacidade de predicir posibles efectos adversos na función cardíaca. Segundo as guías actuais<sup>45</sup>, un dos métodos máis axeitados para avaliar a CDTX durante o tratamento quimioterápico é a valoración da FEVE, xunto cos marcadores séricos cardíacos, troponinas e péptidos natriuréticos<sup>6,108</sup>. Pero unha das principais desvantaxes da determinación da FEVE é a baixa sensibilidade na detección de pequenos cambios na función ventricular, polo que unha FEVE en valores normais non exclúe a disfunción miocárdica<sup>259,260</sup> e unha diminución aparente, xa indica a existencia de dano miocárdico<sup>55</sup>. Distintos estudos indican que o SGL podería ser unha ferramenta máis precisa na detección temperá do dano miocárdico<sup>60</sup>. Recentemente demostrouse a monitorización con SGL fronte a FEVE asóciase a un uso máis frecuente de estratexias de cardioprotección e a un menor risco de deterioro da función ventricular en pacientes tratados con quimioterapia<sup>64</sup>. Pero o seguimento mediante SGL tamén presenta

dificultades, un seguimento fiable e reproducible require formación e experiencia, equipos de alta gama e unha boa ventá de análise.

Neste contexto, é precisa a identificación de novos biomarcadores que permitan unha adecuada estratificación de risco e unha valoración pronóstica do paciente. Os microARNs ademais de ter demostrado un alto valor como biomarcador debido a súa estabilidade na circulación, vense modulados polo estado fisiolóxico do corazón<sup>68,261</sup>. De feito, foi descrita a implicación de microARNs na contractilidade miocárdica<sup>262</sup>, podendo relacionarse con parámetros ecocardiográficos que midan a mesma, como o SGL. A identificación de cambios específicos nos microARNs circulantes e a súa correlación cos parámetros de imaxe indicativos de toxicidade subclínica, coma o SGL, pode proporcionar unha nova ferramenta non invasiva de detección e predición de risco de enfermidades sistémicas coa mínima alteración para o paciente<sup>115</sup>. Se ben, o estudo do perfil de expresión de microARNs no sangue poden constituír unha ferramenta clave no diagnóstico da CDTX subclínica, este non ten porque ser un fiel reflexo do que está a suceder no miocardio. Estudos recentes poñen en valor ás *PBMCs* como unha fonte de biomarcadores capaces de reproducir cambios na metilación e no perfil de ARNm/microARNs en condicións fisiopatolóxicas<sup>124</sup>. Tendo en conta que o grao de homoloxía entre o transcriptoma das células sanguíneas e o tecido cardíaco<sup>131</sup>, e que ao estar sometidas ás mesmas circunstancias fisiopatolóxicas, son capaces de reflexar o estado metabólico e transcriptómico das células cardíacas, o perfil transcriptómico das *PBMCs* pode considerarse unha “biopsia subrogada” do tecido cardíaco<sup>132</sup>.

Outros factores, tales como o perfil metabólico en pacientes que estean a recibir tratamento anticanceríxeno, poden contribuír á hora de desenvolver CDTX por quimioterapia. Está ben estudado que o tecido adiposo, ademais de ser almacén enerxético, posúe actividade endocrina, secretando hormonas que teñen implicación en procesos cardiovasculares<sup>168</sup>. En obesidade, esta actividade endocrina atópase alterada, o cal se asocia co incremento de morbi-mortalidade<sup>169</sup>. Se ben a aparición da CDTX en pacientes con cancro de mama e obesidade é independente do tratamento quimioterápico<sup>167</sup>, en pacientes con cancro de mama foi descrito que un exceso de adiposidade pode ser

beneficioso<sup>156</sup>, podendo explicar a disfunción endocrina do tecido adiposo como un mecanismo potencial na relación entre obesidade e CDTX<sup>171,172</sup>.

Neste traballo buscamos identificar marcadores prognósticos e diagnósticos, así como posibles dianas terapéuticas, que permitan caracterizar o paciente oncológico de cara a unha mellor monitorización e estratificación de risco de CDTX. Para isto, por unha banda caracterizamos os cambios no perfil de microARNs circulantes, en plasma e en *PBMCs*, e por outra os cambios no perfil de expresión de adipokinas relacionadas coa patoloxía CV, con fin de valorar se a “saúde” do tecido adiposo pode xogar algún papel no desenvolvemento da CDTX. Baseándonos en resultados das nosas pacientes e en estudos previos publicados<sup>172</sup> tratamos de avaliar o efecto protector da OMT fronte o dano inducido polo DTX<sup>263</sup>.

## **5.1 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE TOXICIDADE SUBCLÍNICA EN PACIENTES CON CANCRO DE MAMA.**

### **5.1.1 Valoración das características grupos de estudo**

O presente estudo realizouse de maneira prospectiva, con pacientes con cancro de mama, diagnosticadas *de novo* no Servizo de Oncoloxía do Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Á súa vez, estas pacientes foron incluídas nun rexistro nacional que tiña como obxectivo determinar a prevalencia da toxicidade cardiovascular inducida polo tratamento oncológico, así como a utilidade dos parámetros clínicos, bioquímicos e ecocardiográficos no diagnóstico da mesma<sup>7</sup>. En función destes últimos, o estudo estratifica aos pacientes segundo a súa severidade cardiotóxica e conclúe que máis dun 40% de pacientes con cancro de mama presentan signos de CDTX o longo do tratamento. Aínda que a toxicidade severa, entendida como paciente asintomático cunha FEVE <40% ou con síntomas de IC, só se presentaba nun 0,5% das pacientes con cancro de mama, estas tiñan unha mortalidade asociada do 23%. Aínda que os grupos con toxicidade leve ou moderada non mostraron unha evolución desfavorable hai que ter en conta que, o seguimento finalizou aos dous anos, e a toxicidade pode manifestarse ata dez anos máis tarde<sup>264</sup>.

Fronte os resultados do rexistro, que mostran un 38,4% de toxicidade leve nas pacientes con cancro de mama, a prevalencia de toxicidade na nosa poboación, tendo en conta que non se atoparon alteracións nos parámetros bioquímicos, foi do 26,7%, das cales un 18% só mostraron variación na porcentaxe SGL. En comparación, os factores de risco da nosa poboación total, aínda non sendo avaliados a nivel individual, presentan porcentaxes moito máis baixos, o cal pode estar explicando a diferenza na prevalencia. Ademais, en relación ao seguimento, o presente estudo conta un tempo final a un ano, fronte aos dous nos cales se desenvolve o rexistro CARDIOTOX, polo que non se pode descartar un desenvolvemento de CDTX posterior.

Tal e como se comentou con anterioridade, a variación relativa do SGL é un indicador subclínico que anticipa o descenso da FEVE<sup>260,26564</sup> e permite unha monitorización máis adecuada da función cardíaca o longo do tratamento oncolóxico a fin de adoitar estratexias de protección e previr o deterioro da mesma. Por mor disto, co obxectivo de identificar cambios no perfil circulante de microARNs que poidan asociarse a CDTX subclínica, seleccionouse como poboación de estudo as pacientes cunha variación do SGL superior o 12%, en base ao estudo SUCCOUR<sup>266</sup>, ao longo do tratamento, en ausencia de afectación da FEVE. De acordo con estudos previos, nos cales entre un 13 e un 32% dos pacientes mostraban un descenso significativo do SGL<sup>60</sup>, un 18% da nosa cohorte inicial presenta unha diminución relativa por riba do 12% (Figura 50). A continuación seleccionamos un grupo control de características similares en canto o tipo de tratamento, o tempo transcorrido e as doses acumuladas, elementos clave na etiología da CDTX. Cabe destacar a homoxeneidade de ambos grupos, ao non existir diferenzas significativas nos parámetros clínicos, bioquímicos e ecocardiográficos tanto a nivel basal coma no seguimento, salvo a propia diminución do SGL. Atendendo aos factores de risco, son equivalentes en ambos grupos excepto no hábito fumador, que se presenta nun 46,2% naquelas pacientes que desenvolven CDTX subclínica ao longo do tratamento fronte a un 8,3% naquelas nas que non se detectan alteracións no SGL. En canto o seguimento no tempo,

destacar o incremento non patolóxico dos niveis de troponina I ultrasensible en ambos grupos.

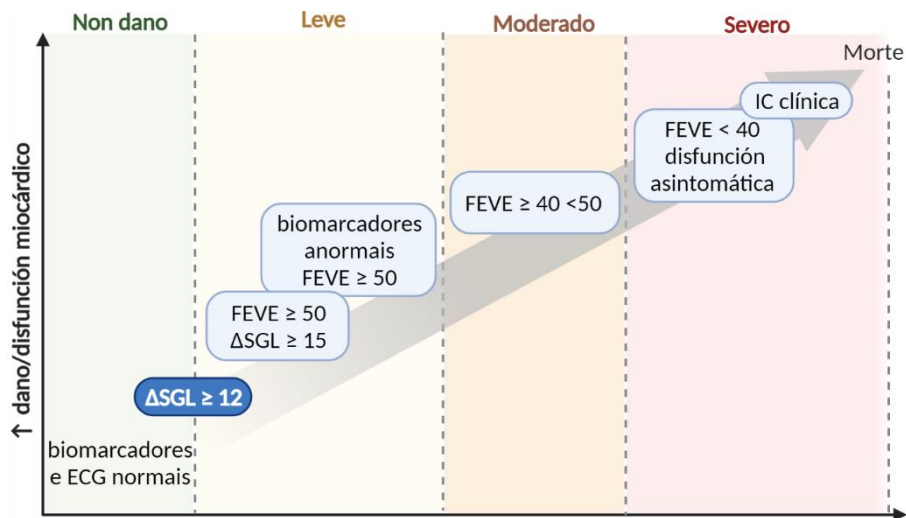


Figura 50. Esquema da gradación da CDTX. En azul escuro o parámetro utilizado neste traballo para definir a CDTX subclínica.

### 5.1.2 Perfil de expresión de microARNs

As diferenzas no perfil de expresión de microARNs entre ambas poboacións, antes do inicio do tratamento oncolóxico, podería proporcionar información sobre a predisposición a desenvolver CDTX subclínica, namentres a regulación dos mesmos o longo do tratamento, proporcionaría información sobre os mecanismos que poder mediar no desenrolo da mesma. Deste xeito, a identificación de diferenzas selectivas podería ser unha ferramenta clave na estratificación de risco do paciente oncolóxico así como na predición, diagnóstico e seguimento dos mesmos.

#### 5.1.2.1 Diferencias de expresión previas ao tratamento quimioterápico

Os resultados obtidos na comparación dos perfís basais mostra uns niveis circulantes máis elevados de hsa-mir-142-3p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-32-5p, hsa-mir-340-5p, hsa-mir-374a-3p e hsa-mir-652-3p



nas pacientes que desenvolveron CDTX subclínica ao longo do tratamento anticancerixeno. Ante a imposibilidade de valorar a contribución do tecido cardíaco ao incremento circulante destes microARNs, fixemos unha “biopsia subrogada” analizando a expresión dos microARNs regulados diferencialmente nas *PBMCs* das pacientes que desenvolveron CDTX subclínica. Tal e como mencionamos anteriormente, as *PBMCs* o estar sometidas as mesmas circunstancias fisiopatolóxicas son capaces de reflexar o estado metabólico e transcriptómico das células cardíacas. O incremento na expresión de hsa-mir-142-3p, hsa-20a-5p e hsa-mir-374a-3p nas *PBMCs* nas pacientes que desenvolveron CDTX subclínica suxire que os niveis circulantes poden ter unha orixe cardíaca e que a maior expresión e niveis en plasma poderían ser un reflexo dunha condición de partida mais vulnerable do miocardio. Pola contra os niveis circulantes de hsa-mir-32-5p, hsa-mir-340-5p e hsa-mir-652-3p non se poderían xustificar en base a regulación miocárdica.

Co fin de discriminar a capacidade diagnóstica destes cambios analizouse a area baixo a curva ROC (AUC, *area under the curve*). Este tipo de análise constitúe un método estatístico que permite avaliar a exactitude discriminativa dun determinado test diagnóstico que utilice variables continuas, a AUC e un reflexo de que tan bo é o test para distinguir pacientes con ou sen enfermidade, neste caso con ou sen probabilidade de desenvolver CDTX subclínica. Os resultados obtidos mostran que tanto as diferencias nos niveis circulantes como o incremento na expresión en *PBMCs* teñen unha elevada especificidade e sensibilidade de cara a aplicacións na práctica clínica como biomarcadores diagnósticos/prognósticos.

#### 5.1.2.2 Diferencias de expresión ao longo do tratamento quimioterápico

Os resultados obtidos na comparación do perfil de microARNs previo ao tratamento contra o perfil no momento no que se detecta a diminución relativa do SGL por riba do criterio de CDTX subclínica, mostra unha diminución dos niveis circulantes de hsa-mir-101-3p, hsa-mir-340-5p e hsa-mir-652-3p. A falta de regulación hsa-mir-101-3p e hsa-mir-340-5p o igual que a regulación inversa de hsa-mir-652-3p nas

*PBMCs* suxire que a regulación dos niveis circulantes non están determinados pola expresión miocárdica destes microARNs. Curiosamente, se ben os cambios son significativos, a análise da *AUC* indica que só os cambios nos niveis circulantes de hsa-mir-652-3p teñen unha especificidade suficiente que poida asociarse á aparición de signos de CDTX subclínica.

Co fin de avaliar se existe un patrón diferencial na expresión de microARNs no momento do tratamento ao cal o SLG se atopa alterado, realizouse o estudo lonxitudinal tanto en plasma como en *PBMCs*. Atopáronse diferencias significativas entre o grupo Control e o grupo CDTX. Neste caso observouse que a expresión dos hsa-mir-101-3p, hsa-mir-340-5p e hsa-652-3p encóntranse diminuída no momento de CDTX subclínica con respecto ao control nas mostras de plasma. Pola contra, o único microARN que se expresa diferencialmente de maneira significativa nas *PBMCs* é o hsa-mir-652-3p, revela unha tendencia contraria ao plasma.

Aínda que diversos estudos relacionan o **hsa-mir-142-3p** con patoloxía cardiovascular, a bibliografía actual mostra resultados contraditorios tanto en modelos preclínicos como en pacientes. O incremento da expresión do mir-142-3p mellora a función mitocondrial en modelos murinos de hipertrofia por constrición aortica<sup>215</sup> e prevén a resposta fibrótica/apoptótica en cardiomiocitos suxeitos a dano por hipoxia-reoxixenación<sup>216</sup>. Pola contra, datos recentes mostraron un incremento dos niveis circulantes en pacientes con anxina inestable<sup>267</sup> e infarto<sup>268</sup>. Por outra banda, distintos estudos clínicos mostraron unha redución significativa dos niveis circulantes en pacientes con IC<sup>218, 219</sup> e cardiomiopatía dilatada de orixe non isquémico<sup>129</sup>.

Se ben hai estudos comparativos do perfil de expresión de microARNs na busca de marcadores diagnósticos ou pronósticos en pacientes que desenvolven CDTX o longo do tratamento quimioterápico, ningún traballo atopou diferencias no hsa-mir-142-3p a nivel basal. En base os estudos actuais que relacionan o mir-142-3p coa patoloxía CV resulta difícil xustificar unha maior susceptibilidade a desenvolver alteracións do SGL en base ao incremento dos niveis circulantes, dado que ningún outro dato das nosas pacientes xustifica un evento agudo ou unha reposta compensatoria fronte a unha situación

de estrés, o mir-142-3p foi descrito como un supresor de tumores no cancro de mama. A súa sobreexpresión aumenta a sensibilidade das células tumorais o efecto citotóxico das antraciclinas<sup>269</sup>. Aínda que non existen estudos previos que analicen se pode exercer un efecto similar sobre os cardiomiocitos, o incremento significativo na expresión nas *PBMCs* suxire que o miocardio das pacientes que desenvolven unha diminución do SGL pode ser estar expresando niveis máis elevados de mir-142-3p e polo tanto ser máis susceptible o dano das antraciclinas. Neste senso, os resultados de susceptibilidade e especificidade, cunha *AUC* en plasma e en *PBMCs* por riba de 0,8, propoñen ao hsa-mir-142-3p como un bo predictor de CDTX subclínica en pacientes de cancro de mama.

En canto á regulación asociada o tratamento oncolóxico, no noso caso, en coherencia co descrito en modelos de IC<sup>218, 219</sup> e cardiomiopatía dilatada<sup>129</sup>, a expresión do hsa-mir-142-3p mostra unha diminución respecto os niveis basais, que non acada valores significativos posiblemente debido a que as nosas pacientes non desenvolven en ningún momento unha diminución significativa da FEVE.

Fronte a traballos recentes que asocian baixos niveis circulantes de **mir-20a** coa CDTX<sup>153</sup>, os nosos datos mostran que as pacientes con variación do SGL ao longo do tratamento, teñen niveis basais máis elevados. Estas diferencias poden ser debidas á heteroxeneidade das cohortes estudadas. Mentres o noso criterio foi establecer unha poboación asintomática, sen CDTX clínica, as cohortes estudadas en ambos traballos non só presentan CDTX sintomática, con alteración significativa da FEVE e de marcadores séricos de dano cardíaco, senón que a disfunción cardíaca presentase aos 4 meses fronte aos 6 meses que tarda en aparecer a alteración do SGL na nosa cohorte. De calquera xeito, non podemos descartar que se as nosas pacientes evolucionasen a unha CDTX aberta, con alteración sintomática da FEVE, os niveis de miR-20a diminuísen acorde os estudos anteriores.

En modelos animais de IC os niveis circulantes de mir-20a asociáronse ao proceso de remodelado cardíaco<sup>270</sup>. Do mesmo xeito, en pacientes con IC describiuse unha correlación entre os niveis circulantes de mir-20a-5p e o grao de dilatación ventricular<sup>270</sup>. Se ben, estamos a falar de niveis basais e non existen alteracións

ecocardiográficas que poidan xustificar a diferenza entre ambos grupos, unha maior expresión basal de hsa-mir-20a-5p en plasma e *PBMCs* podería suxerir un contexto de susceptibilidade que contribúa a alteración do SGL neses individuos, ademais de poder ser utilizados como biomarcador predictor, cun *AUC* por riba de 0,8 en plasma, e 0,964 en *PBMCs*.

Modelos *in vitro* demostraron o papel antiapoptótico de mir-20a fronte o dano por I/R<sup>271</sup>. Os nosos datos en *PBMCs* suxiren un aumento da expresión miocárdica en pacientes que sofren unha diminución do SGL, aínda que non de maneira significativa.

Os nosos datos mostran que as pacientes que desenvolven una diminución do SGL tralo tratamento teñen niveis basais mais elevados de **hsa-mir-32-5p**. Estudos funcionais en ratos demostran que o mir-32 ten un papel directo no desenvolvemento da patoloxía CV ao promover a calcificación vascular<sup>233</sup>. Coherentemente, niveis elevados do hsa-mir-32-5p foron descritos en sangue de pacientes que padecen EAC<sup>233,272</sup> e en naqueles con infarto agudo de miocardio<sup>273</sup>. Por outra banda, estudos *in vitro* en fibroblastos cardíacos revelaron que o mir-32-5p promove a proliferación e altera o fenotipo dos fibroblastos<sup>274</sup> o que suxire un papel directo na fibrose cardíaca e en consecuencia na función ventricular. Niveis elevados no grupo de toxicidade subclínica suxire de novo a existencia dun contexto de susceptibilidade que pode contribuír a alteración do SGL neses individuos.

Polo momento existen poucos estudos de describan ao hsa-mir-32-5p como marcador basal de susceptibilidade de enfermidades ou alteracións CV subclínicas, como mostran os resultados deste traballo no plasma, cunha *AUC* por riba de 0,8 outorgándolle valor como biomarcador predictivo. Con isto, ben é certo que o hsa-mir-32-5p non mostra cambios a nivel lonxitudinal, e aínda que o noso grupo de pacientes non teña diagnosticada unha patoloxía clínica como tal, podería ser interesante estudar as dianas ARNm que se atopan inhibidas no tempo de detección de variación do SGL que puideran alterando a funcionalidade miocárdica.

Distintos estudos mostran a implicación de **mir-340** na progresión de varias enfermidades, non só patoloxía CV. En relación con esta última, distintos traballos mostraron un incremento nos niveis

circulantes en pacientes con IC<sup>270,275</sup>. En estudos levados a cabo en modelos murinos de IC post-infarto, obsérvase que este incremento nos niveis circulantes ven acompañado dun incremento na expresión nas *PBMCs*, que se mantén significativo só nas 8 primeiras semanas post-infarto<sup>270</sup>. A sobreexpresión en cardiomiocitos neonatais incrementa a expresión de ANP e BNP, mentres en modelos preclínicos asociouse a un proceso de remodelado hipertrófico<sup>238</sup>. En coherencia co seu papel no remodelado cardíaco en modelos de dano por I/R observouse que o incremento de expresión no miocardio limitábase á rexión non isquémica<sup>276,277</sup>.

Os nosos datos mostran que as pacientes que sofren unha alteración do SGL no tempo, presentan niveis basais máis elevados de miR-340 en sangue pero que estes diminúen significativamente no momento no que o SGL se mostra alterado. Pola contra, mostran unha menor expresión basal de mir-340-5p nas *PBMCs*, que se mantén no tempo, isto suxire que as pacientes que sofren unha alteración do SGL manteñen niveis de expresión no miocardio máis baixas, o que podería xustificar a diminución dos niveis circulantes e ser indicativo dunha menor capacidade de resposta adaptativa ante os danos asociados a quimioterapia. Ademais, tanto no plasma como nas *PBMCs* a nivel basal, a curva COR válida ao hsa-mir-340-5p como biomarcador predictor de CDTX, cunhas AUC curva de 0,897 e 0,766 respectivamente.

Distintos traballos poñen de manifesto o papel de **mir-374** na fisiopatoloxía da enfermidade CV. Demostrouse que a sobreexpresión de mir-374 en cardiomiocitos neonatais induce hipertrófica miocárdica<sup>240</sup>. Por outra banda, en modelos de I/R con e sen preconditionamento demostrouse que a sobreexpresión de mir-374 exerce un efecto cardioprotector modulando respectivamente a actividade do factor de transcripción proteína específica 1 (SP1)<sup>242</sup> e MAPK6<sup>278</sup>. SP1 é un factor de transcripción implicado na expresión de SERCA, polo que mir-374 parece estar directamente implicado na homeostase do calcio<sup>279</sup>. Pacientes con estenose aórtica mostraron unha correlación negativa entre os niveis de angiotensina II na expresión miocárdica, o que suxire un papel modulador dos efectos deletorios do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS)<sup>280</sup>.

Os nosos resultados revelan unha maior expresión nas *PBMCs* así como niveis circulantes máis elevados antes do inicio do tratamento nas pacientes que desenvolven CDTX subclínica, cunhas *AUCs* de 0,871 e 0,916 respectivamente, podendo ser utilizados como biomarcadores predictivos de CDTX subclínica. Se ben pola falta de aproximacións mecanísticas non podemos establecer se estas diferenzas xogan algún papel no desenvolvemento da mesma, os nosos resultados suxiren que os niveis de expresión do hsa-mir-374a-3p poderían ser un biomarcador diagnóstico/prognóstico de fácil acceso. Datos recentes suxiren ademais o potencial predictivo da expresión de mir-374 en pacientes con lesión aterosclerótica non sintomáticos. Estes presentan un incremento significativo nos niveis circulantes de mir-374 que ademais correlacionan con grosor intima-media carótide<sup>281</sup>. Por outra banda, estes datos abren a porta a valorar se a existencia de lesión subclínica é un elemento determinante na aparición de CDTX precoz, ou ben se independentemente da lesión aterosclerótica existen mecanismos fisiopatolóxicos comúns que poidan estar mediados polos altos niveis de expresión do hsa-mir-374a-3p.

A pesar de que o **mir-652** se atope entre os microARNs con maior expresión no miocardio adulto<sup>282</sup>, distintos estudos poñen de manifesto o un papel deleterio en distintas condicións patolóxicas. En modelos de constricción aórtica o incremento de expresión no miocardio vai asociado o remodelado funcional, fibrose, hipertrofia e perda de capacidade funcional<sup>283</sup>. Pola contra, outros estudos establecen un papel beneficioso. En modelos *in vitro* e *in vivo* de I/R, mir-652-3p atenúa a fisión mitocondrial e a apoptose<sup>251</sup>. En pacientes con IC de mal prognóstico, foi descrita unha correlación negativa entre os niveis circulantes de mir-652-3p e ST-2, un marcador de fibrose e inflamación, en condicións de stres cardíaco<sup>284</sup>. En coherencia, distintos estudos correlacionan baixos niveis circulantes de mir-652-3p cunha maior taxa de reingreso<sup>250</sup> e mortalidade<sup>249</sup> en pacientes con IC así como de enfermidade arterial periférica<sup>252</sup>. Nos nosos resultados, os niveis basais en plasma atópanse elevados en pacientes que desenvolverán CDTX subclínica, sen poder ser asociado con patoloxías CV pode describirse como un marcador de susceptibilidade e predictor, cunha *AUC* de 0,827.

No momento da caída do SGL os nosos resultados mostran por una banda unha diminución dos niveis circulantes e por outra un incremento na expresión en *PBMCs*, o que podería suxerir unha maior expresión miocárdica, en ambos casos asemella que a regulación de mir-652-3p podería establecer un contexto profibrótico, o inicio de un remodelado funcional que podería concluír nos casos de CDTX sintomática coa perda de capacidade funcional<sup>283</sup>. En ambos tecidos, o hsa-mir-652-3p ten potencial uso como biomarcador diagnósticos, cunha área baixo a curva de 0,806 en plasma, e 0,736 en *PBMCs*.

Os nosos datos mostran tamén unha diminución significativa dos niveis circulantes de **hsa-mir-101-3p** no momento da caída do SGL. Estudos recentes suxiren que a inhibición de miR-101 xoga un papel deleterio en distintas enfermidades cardiovasculares. En mostras de ventrículo esquerdo de pacientes con cardiomiopatía isquémica e cardiomiopatía dilatada, atopouse unha diminución significativa da expresión do mir-101<sup>285</sup>. Do mesmo xeito, en modelos animais de infarto<sup>204</sup> e cardiomiopatía hipertrófica<sup>203</sup> observouse una diminución significativa na expresión miocárdica. Estudos funcionais nestes modelos demostraron que a sobreexpresión de mir-101 diminúe a fibrose intersticial e mellora función cardíaca nas ratas infartadas<sup>204</sup> e a hipertrofia en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con anxiotensina II<sup>203</sup>. En fibroblastos procedentes de cultivo primario de rata mostraron unha redución significativa da expresión do hsa-mir-101 baixo condicións de hipoxia<sup>202</sup>. Aínda que os nosos datos non mostran unha redución significativa na expresión nas *PBMCs* que suxira unha menor expresión miocárdica, non podemos descartar que a diminución observada nos niveis circulantes das nosas pacientes poda estar implicada na caída do SGL, posuíndo ademais potencial para ser utilizada como biomarcador diagnóstico, cun *AUC* de 0,757.

Sembra entón que os resultados obtidos no estudo lonxitudinal en plasma van en concordancia co descrito ata agora, podendo ser interesante avaliar a expresión en pacientes nos que a FEVE se atope a niveis cardiotóxicos.

#### 5.1.2.3 Estudo de targeting

O estudo *in silico* de dianas, permítenos identificar os xenes diana dos microARNs regulados de xeito diferencial, para en función



dos mesmos identificar, a nivel CV, as vías con maior probabilidade de verse afectadas. Co obxectivo de aumentar a fiabilidade da análise, descartamos as bases predictivas baseadas na interacción microARNs-ARNm, empregando só ferramentas que identifican dianas validadas de xeito experimental e analizamos os patróns de expresión en cada momento, antes e durante o tratamento quimioterápico, non microARNs individualizados.

A **nivel basal** meirande parte de rutas que veñen representadas en ambos tecidos son aquelas implicadas na transdución de sinais que teñen que ver coa supervivencia (ErbB, Ras e PI3K-Akt) e proliferación celular (TGF $\beta$ ), a homeostase (AMPK), e a hipertrofia (Hippo) así como tales a sinalización adrenérxica en cardiomiocitos e a síntese e secreción de aldosterona.

De xeito específico nas *PBMCs*, atópanse moduladas as vías de comunicación celular (Rap1, cAMP) e a reabsorción de sodio regulada por aldosterona, mentres no plasma atópanse alteradas vías implicadas na supervivencia (FoxO, Wnt e mTOR), na resposta inflamatoria (TNF), no metabolismo (HIF-1) cardiomiopatía arritmoxénica, na resistencia a insulina e na regulación do citoesqueleto de actina.

A falta de facer estudos funcionais os nosos datos mostran que tanto en plasma como en *PBMCs* as diferenzas atopadas no perfil de microARNs poderían estar implicadas nunha menor capacidade adaptativa e polo tanto unha maior susceptibilidade a desenvolver alteracións da función cardíaca durante o tratamento oncolóxico.

En canto ao estudo de *targeting* dos microARNs regulados a **nivel lonxitudinal**, na análise dos microARNs procedentes de plasma mantéñense representadas as vías de transdución de sinais comúns ao estudo basal tales como MAPK, AMPK, Hippo, Ras, TGF $\beta$ , Wnt, PI3K-Akt, cAMP e ErbB, ademais da regulación do citoesqueleto de actina. Outras rutas que se atopan en común co estudo basal son a ruta de sinalización de adipokinas, a apoptose. A ruta de sinalización mTOR, de FoxO e de adipokinas veñen tamén representadas tamén nas *PBMCs*, aparecendo de novo no estudo lonxitudinal.

En plasma, ademais, a nivel lonxitudinal aparecen a ruta de sinalización de adipocitokinas, a apoptose, a ruta de sinalización de Rap1, de VEGF e de cAMP. En *PBMCs*, ademais das xa mencionadas,



atópanse a ruta a sinalización da insulina e a cardiomiopatía hipertrófica.

Os cambios específicos observados nas *PBMCs* no momento no que se atopa alterado *SGL*, suxírense están a producir cambios na expresión xénica no miocardio por mor da alteración do hsa-mir-652-p, que poderían estar implicados na alteración do mesmo. Estes resultados abren as portas a realizar estudos de expresión tanto *in vivo* como *in vitro* que poidan revelar os mecanismos moleculares polos cales se desenvolve a CDTX subclínica por quimioterapia.



### 5.1.3 Adipokinas e CDTX

Na segunda parte deste traballo analizamos o perfil de expresión de adipoquinas relacionadas coa patoloxía CV, con fin de valorar se a “saúde” do tecido adiposo e pode xogar algún papel no desenvolvemento da CDTX e avaliamos o efecto protector da OMT fronte o dano inducido polo DTX.

O cancro e a enfermidade CV son as dúas principais causas de morte a nivel mundial. Aínda que historicamente foron consideradas como dúas entidades independentes, a presenza de características e de factores de risco en común suxiren unha bioloxía compartida. Fronte a cantidade de estudos sobre relación patoloxía CV-obesidade, a relación desta última co cancro foi menos estudada e a súa relación é mais controvertida<sup>156</sup>.

Por unha banda a obesidade foi identificada como o segundo factor de risco de cancro en fumadores, o primeiro en non fumadores<sup>157</sup>. Aínda que os mecanismos moleculares que relacionan a obesidade co risco/prognose do cancro non son de todo coñecidos, a obesidade crea un medio hospedador caracterizado por unha inflamación sistémica de baixo grado, alteración da sinalización dos esteroides sexuais e incremento da insulina/factores de crecemento que poden provocar proliferación celular e progresión malignos. Por outra banda, hai estudos que exclúen a obesidade como factor de risco e outros que afirman que diminúe a incidencia de determinados tipos de cancro<sup>156</sup>.

Ademais de no risco e no pronóstico do cancro, hai estudos que demostran unha clara relación entre a obesidade e a CDTX asociada o tratamento do cancro, o que poden estar contribuíndo o peor pronóstico do mesmo<sup>160</sup>. As causas desta asociación non están totalmente claras. Por unha banda están as cuestións individuais que poderían explicar a co-ocorrência de ambas entidades e a maior susceptibilidade á toxicidade, independentemente dos factores de risco do estilo de vida<sup>163</sup>, como e a xenética individual<sup>161</sup> ou o propio axuste do tratamento en función do peso<sup>162</sup>. Por outra banda están aspectos funcionais, como unha maior duración en sangue, debido o cambios das propiedades farmacocinéticas das antraciclinas<sup>164</sup> e fisiopatolóxicos, que supoñen un aumento do estrés oxidativo, desregulación do

metabolismo enerxético, a dilatación ventricular e a alteración da función sistólica<sup>165,166</sup>. En modelos de sobrepeso por sobrealimentación neonatal demostrouse a aparición de CDTX a doses menores que en animais normopeso, o que demostra unha maior sensibilidade os efectos cardiotóxicos das antraciclinas<sup>166</sup>.

O feito de que en pacientes con cancro de mama e obesidade a aparición de CDTX sexa independente do tratamento<sup>167</sup>, pon o punto de mira na propia obesidade, sen embargo, a heteroxeneidade observada na relación obesidade-cancro na que un exceso de adiposidade pode ser incluso beneficiosa<sup>156</sup>, pon o punto de mira na calidade ou funcionalidade do tecido adiposo.

Deste xeito, o incremento da morbi-mortalidade asociada a obesidade é principalmente atribuíble a un tecido adiposo disfuncional<sup>169</sup>. Datos recentes en pacientes asintomáticos mostraron que as anomalías metabólicas e non a obesidade en si son o verdadeiro factor de risco para a progresión do cancro<sup>170</sup>. Nesta relación a actividade endocrina do tecido adiposo está emerxendo como un factor pronóstico clave<sup>286,287</sup>.

Polo tanto, nun contexto de sobrepeso/obesidade e cancro, por una banda, a hipertrofia do tecido adiposo supón un contexto inflamatorio que altera a actividade metabólica do adipocito, incrementado a produción e secreción de adipokinas<sup>169</sup>, e por outra banda as células tumorais son capaces de mudar o fenotipo dos adipocitos, favorecendo a lipólise e modulando a expresión de citokinas proinflamatorias, que á súa vez incrementan a agresividade do tumor<sup>173</sup>. Os devanditos cambios na función endocrina do tecido adiposo xogan un papel crucial no incremento da susceptibilidade a desenvolver CDTX<sup>171,172</sup>.

Datos recentes mostraron que a **OMT** contrarresta a apoptose do cardiomiocito inducida por antraciclinas *in vitro* a través da inhibición do estrés oxidativo<sup>172</sup>, unha adipokina liberada polos depósitos viscerais e diminuída en pacientes con obesidade<sup>174</sup>. Algúns estudos mostran unha estreita relación entre os niveis circulantes de OMT e a saúde CV. Baixos niveis de OMT están relacionados con enfermidade coronaria, IC, infarto agudo de miocardio e enfermidade isquémica en pacientes con DM tipo 2<sup>288,289</sup>. Estudos previos demostran un efecto protector da OMT como axente terapéutico para enfermidades CV<sup>290</sup>.

Como foi demostrado previamente, a OMT reduce a apoptose en H9c2 tratadas con DOX<sup>172</sup>, tamén reduce a apoptose en ratas en condicións de isquemia cerebral<sup>291</sup> e en ratos suxeitos a isquemia miocárdica seguida de reperusión<sup>183</sup>. En células HUVEc, a OMT incrementa a diferenciación a estruturas vasculares e diminúe a actividade apoptótica baixo condicións de privación de soro<sup>292</sup>.

Os resultados deste traballo mostran uns niveis elevados de OMT en plasma naquelas pacientes que non desenvolven CDTX subclínica, en concordancia coa función cardioprotectora desta adipokina descrita ata agora<sup>172</sup>. Estes cambios mantéñense ó longo do tratamento quimioterápico, polo que semella que os axentes anticancerixenos non alteran a regulación da OMT, e que esta consegue exercer a súa función protectora ó longo do tratamento. Ademais, apoiando estes resultados, a OMT correlaciona negativamente coa variación da porcentaxe de SGL. De acordo co patrón de expresión dos microARNs no plasma, a OMT presenta una correlación inversa co hsa-mir-142-3p. Todos estes datos en conxunto indican que a omentina xunto co hsa-mir-142-3p e o hsa-mir-652-3p poden actuar como biomarcadores de susceptibilidade a desenvolver CDTX subclínica, e que baixos niveis de OMT en plasma están correlacionados cunha maior variación da porcentaxe de SGL en pacientes que reciben tratamento quimioterápico.

A **adiponectina (AdipoQ)** é considerada unha adipocitokina antiinflamatoria, expresada e secretada en cardiomiocitos que induce gasto enerxético e oxidación de ácidos grasos<sup>168</sup>. En condicións non relacionadas coa obesidade, os niveis de AdipoQ poden aparecer incrementados en enfermidades autoinmunes ou inflamatorias, como en DM tipo I, artrites reumatoide e fallo cardíaco sistólico crónico<sup>293</sup>. Describiuse que elevados niveis de adiponectina correlacionan ca disfunción diastólica do ventrículo esquerdo en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica<sup>294</sup>, e poden ser predictivos de mortalidade en pacientes con IC crónica<sup>295</sup>. Aprahamian e col. propoñen dúas posibles explicacións para o aumento dos niveis de AdipoQ nestas condicións<sup>293</sup>. Por un lado a elevación da AdipoQ podería ser unha resposta compensatoria ao estrés do fallo cardíaco, e por outro lado poderían vir explicados polo desenvolvemento de resistencia á adiponectina<sup>296</sup>. Os nosos resultados mostran uns niveis basais de AdipoQ máis elevados

naquelas pacientes que van desenvolver CDTX ao longo do tratamento. Á súa vez, os niveis de AdipoQ a nivel basal correlacionan de maneira directa coa variación da porcentaxe de SGL. O feito de que os niveis de AdipoQ se atopen elevados previamente a recibir tratamento quimioterápico nas pacientes que van desenvolver CDTX subclínica poida deberse a unha resposta compensatoria ou á condición de resistencia a AdipoQ abre unha oportunidade de estudo. Aínda con isto, segundo os resultados desta tese, tendo en conta a correlación directa da AdipoQ coa variación da porcentaxe do SGL, esta adipokina podería ter un potencial uso biomarcador de predición para abordar estratexias de prevención de desenvolvemento de CDTX inducida por quimioterapia.

Esta ben estudiao o uso da **galectina 3** como un biomarcador de fibrose en diversas patoloxías cardíacas<sup>297,298</sup>. De feito, está sendo materia de estudo a avaliación de gal3 como un posible biomarcador de CDTX por quimioterapia, aínda que ata o momento non se conseguiu asociar a gal3 co desenvolvemento de CDTX<sup>88</sup>. Os resultados deste traballo mostran un descenso dos niveis de gal3 durante o tratamento quimioterápico no grupo que non desenvolve toxicidade subclínica. Recentemente, Tian *et al.* suxeriron que a gal3 media na CDTX inducida por DOX e que a inhibición de gal3 atenúa a disfunción cardíaca inducida por DOX incrementando a expresión de Prx-4 para reducir o estrés oxidativo do miocardio<sup>195</sup>. Se ben se describe a correlación da Gal3 circulante e o SGL patolóxico<sup>299</sup>, en ausencia de enfermidade CV sembra que a diminución da Gal3 no grupo control podería ser unha resposta adaptativa fronte á potencial acción cardiotóxica dos tratamentos quimioterápicos e que esos baixos niveis poden estar protexendo o grupo control dos danos producidos pola quimioterapia.

## **5.2 EFECTO DA OMT SOBRE A CDTX NUN MODELO *IN VITRO***

### **5.2.1 Viabilidade e apoptose asociadas ao tratamento con DTX/OMT**

En liña co publicado ata agora en torno á protección da OMT fronte ao dano producido por DOX en células H9c2<sup>172</sup>, realizouse un estudo

*in vitro* paralelo co rol da OMT na CDTX producida por taxanos na mesma liña celular<sup>263</sup> (Anexo). Neste traballo, demóstrase que a OMT reduce significativamente a necrose e a apoptose en cardiomioblastos H9c2 inducida por DTX, así como se mostrou coa DOX<sup>172</sup>. Os datos mostran o incremento notable de estrés oxidativo e do ERE en H9c2 cando son tratadas con DTX, acompañado dun pronunciado descenso da viabilidade, como foi previamente descrito<sup>255,300,301</sup>. Previamente foi descrito que o DTX induce a apoptose dependente de caspasa-3 nunha liña celular humana de cancro de próstata<sup>27</sup>, nunha liña celular humana de carcinoma oral de células escamosas<sup>302</sup>, e en células de carcinoma de ovario e de mama<sup>28</sup>, pero esta é a primeira vez que se asocia unha acción directa do DTX en células H9c2 co incremento da actividade de caspasa-3 e o incremento da morte celular.

### 5.2.2 Estrés oxidativo e OMT

O estrés oxidativo xoga un papel central na morte dos cardiomiocitos en algunhas enfermidades CV<sup>303</sup>. As NADPH oxidasas (NOX) son o maior produtor de O<sup>2-</sup>, sendo as isoformas NOX2 e NOX4 as que se expresan no músculo cardíaco. Foi descrito previamente que o aumento da expresión de NOX4 por estímulos hipertróficos incrementa a apoptose e disfunción mitocondrial en miócitos cardíacos. Foi demostrado tamén, que NOX4 é unha importante fonte de estrés oxidativo en enfermidade CV<sup>304</sup>. Datos previos demostran que o tratamento con DTX incrementa a actividade de NOX en células HUVEC resultando nunha formación de ROS<sup>255</sup>, mentres que a OMT inhibe a actividade NOX en células vasculares do músculo liso despois do tratamento co TNF $\alpha$  e o factor de crecemento derivado de plaquetas<sup>305,306</sup>. Estudouse entón como o DTX podería causar tamén un incremento no estrés oxidativo que xustifique o incremento de morte celular nos cardiomiocitos e se a OMT sería capaz de contrarrestar o incremento de estrés como nas células vasculares de músculo liso. Os resultados demostran un incremento significativo da formación de EROs en células H9c2 tratadas con DTX pero non mostraron ningunha mellora despois do tratamento con OMT a pesar da diminución significativa na expresión de NOX4; as isoformas 1 e 2 de NOX non se encontran alteradas no noso modelo experimental. Aínda que a OMT

pode influir na actividade de enzimas antioxidantes endóxeas alternativas, incluíndo a súper óxido dismutasa (SOD), a catalasa (CAT) e a glutatión peroxidasa (GPx)<sup>172</sup>, os datos indican que o descenso na morte celular non está asociado a estrés oxidativo máis baixo xa que a OMT non contrarresta o incremento nos niveis de EROs. O estrés oxidativo, causado pola sobreproducción de EROs e o descenso dos niveis de antioxidantes, é previsto ou suprimido polas principais enzimas antioxidantes, incluídas SOD, CAT e GPx. Neste estudo, o tratamento con DTX incrementa a expresión xénica de CAT, GPx e SOD1, probablemente como unha resposta compensatoria contra os niveis máis altos de EROs ou actividade enzimática reducida, previamente descrita, asociada ao tratamento con DTX<sup>307,308</sup>. Sen embargo, solo no caso dos niveis proteicos da SOD1 ese aumento resulta significativo. Coherentemente, coa ausencia do efecto da OMT no estrés oxidativo, esta non exerce ningún papel na expresión de enzimas antioxidantes neste modelo. Os datos suxiren que a OMT exerce o seu papel protector a través doutras vías de dano.

### 5.2.3 Estrés do retículo endoplasmático e OMT

Na actualidade, a apoptose do cardiomiócito mediada polo estrés de retículo endoplasmático (ERE) está atraendo moita atención, xa que atopouse que é responsable da patofisioloxía de moitas enfermidades CV<sup>309</sup>. O RE é un orgánulo responsable do pregamento de proteínas secretoras e de membrana. Diferentes estímulos causan a acumulación de proteínas non pregadas e mal pregadas, disociando BiP dos tres sensores proteicos transmembrana PERK, Atf6 e IRE1, desencadeando así a resposta a proteínas despregadas (UPR)<sup>310</sup>. No 2017 foi descrito que despois de estímulos fortes ou prolongados, actívanse CHOP, caspasa-12, e outras rutas de sinalización apoptótica dependentes de JNK. A ruta apoptótica CHOP activa a caspasa-3 relacionada coa familia proteica de Bcl-2<sup>309</sup>. Datos previos demostran que a apoptose inducida por DTX está mediada pola indución do ERE<sup>300</sup>. Con isto, analizouse a expresión dos xenes implicados no ERE como BiP, CHOP, Atf6, XBP1, GADD34 e MCP1 en células H9c2 tratadas con DTX e o efecto do cotratamento con OMT na expresión xénica do ERE. Aínda que de xeito convencional a resposta ao estrés ERE desencadea unha



aumento na expresión de BiP<sup>310</sup>, os resultados mostran unha regulación á baixa da expresión de BiP contrarrestada por OMT. Sen embargo, de acordo coa resposta ao ERE convencional os niveis proteicos de BiP incrementáanse despois do tratamento con DTX e diminúen despois do cotratamento con OMT. CHOP é unha molécula implicada na apoptose inducida polo ERE, baixo condicións de non estrés a expresión de CHOP é baixa, pero incrementase en resposta a ERE a través da indución transcricional dependente de IRE1, PERK e Atf6<sup>311</sup>. Ademais, propúxose que a sinalización ERE, especialmente mediada por Atf6, induce a XBP1<sup>312</sup> e desenvolve un papel decisivo na indución da apoptose en tecidos musculares a través da activación da caspasa-12 e posteriormente da caspasa-3<sup>313</sup>. Os resultados mostran un aumento da expresión de Atf6 significativa inducida por DTX, en consonancia datos publicados previamente en células humanas de melanoma<sup>300</sup>, de acordo con estes resultados a análise proteica mostra tamén un incremento na expresión de Atf6 $\alpha$  despois do tratamento con DTX e un descenso despois do cotratamento con OMT, e un incremento significativo da expresión de CHOP contrarrestado despois do tratamento con OMT. O incremento de Atf6 vai acompañado por un sutil, aínda que non significativo, incremento dos niveis de XBP1, que tamén vén inhibido por OMT. Acorde co papel do DTX como causante do ERE en células HL60 despois de 24 horas<sup>314</sup>, os resultados mostran un marcado descenso na expresión de GADD34 que é recuperada cando as células H9c2 son cotratadas con OMT. Así como se mostrou previamente en células de cancro de próstata, o tratamento con DTX nas células H9c2 tamén incrementa a expresión proteica de p~eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ , que vén reducido despois do cotratamento con OMT<sup>300,301,315</sup>. Ademais, os resultados tamén mostran un incremento da expresión non significativa da proteína inducida por proteínas quimiotácticas monocitárias (MCPIP) inhibida por OMT. En base a datos previos, o aumento de expresión de MCPIP está probablemente asociada con un incremento, previamente descrito, na expresión de MCP1<sup>316</sup> inducida por DTX<sup>317</sup>.

Evidencias crecentes avalan a perspectiva de que o estrés oxidativo e de RE teñen unha forte conexión. As EROs prodúcense como subproductos durante o proceso de pregamento das proteínas, o que



reduce o estado red-ox, pero o estado red-ox alterado leva a un maior ERE, xa que o proceso de pregamento das proteínas depende da homeostase red-ox. Polo tanto, a fin de avaliar se a atenuación dos niveis incrementados de EROs alivia o ERE, cotratáronse as células H9c2 con N-acetilcisteína (NAC), un *scavenger* de EROs, previamente descrito como axente cardioprotector contra a toxicidade inducida por antraciclinas<sup>318</sup>. Os resultados mostran que a redución de estrés oxidativo, asociado co pretratamento con NAC, regula os cambios na expresión xénica de CHOP e na expresión proteina de Atf6 inducidos polo DTX, pero non nas outras proteínas implicadas no ERE que foron analizadas. Os resultados indican que os efectos da OMT no ERE non están asociados co estado red-ox<sup>319</sup>.

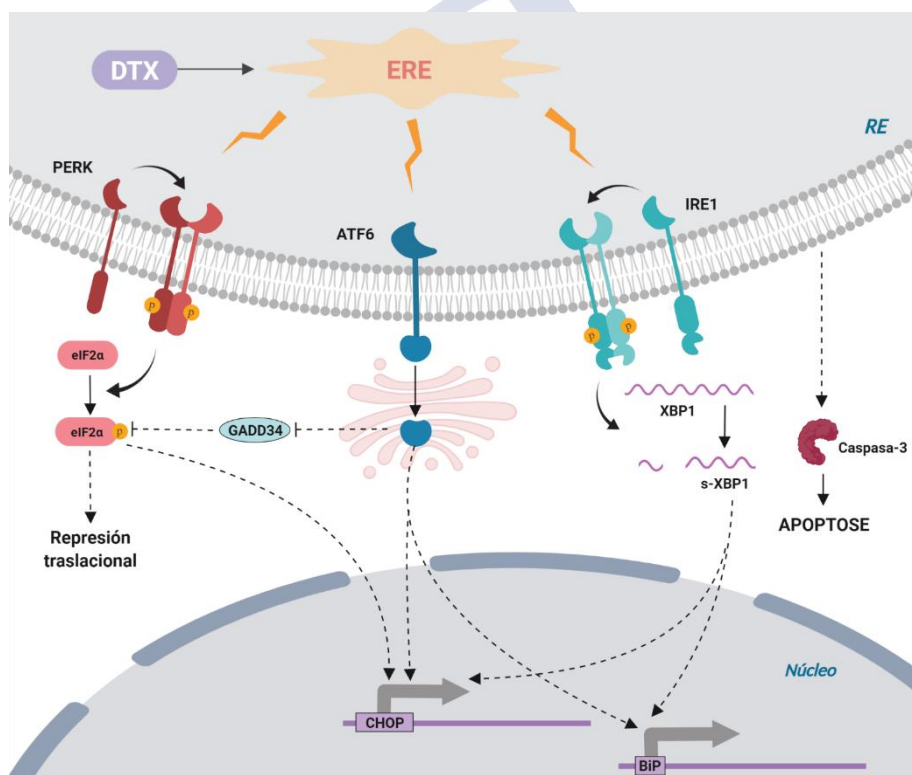


Figura 51. Mecanismo de CDTX inducido por DTX: Implicación do ERE. Realizada con BioRender.com.

En resumo, os datos mostran que o DTX ten un efecto directo no cardiomióblastos, incrementando o estrés oxidativo e de RE e en consecuencia a morte celular, suxerindo que pode ter un papel directo no desenvolvemento de toxicidade miocárdica. Os resultados non aclaran se a OMT contrarresta ou prevén a aparición do ERE, pero demostran con claridade que a OMT, pese a non reducir o estrés oxidativo producido por DTX, contrarresta o ERE e prevén a apoptose. Estes datos apuntan a que o tratamento con OMT pode contribuír a diminuír a susceptibilidade da CDTX inducida por DTX. Os resultados obtidos neste traballo serán útiles para explorar a posibilidade de que a omentina sexa utilizada como tratamento contra a CDTX polo docetaxel.





# CONCLUSIÓN





## 6 CONCLUSIONES

---

As conclusión acadadas nesta teses segundo os obxectivos establecidos foron as seguintes:

1. A valoración ecocardiográfica do *strain* global lonxitudinal permite a identificación de cardiotoxicidade subclínica antes de que exista dano miocárdico.
2. As diferencias no perfil basal de expresión nos microARNs poderían xustificar a diferente predisposición a desenvolver cardiotoxicidade subclínica.
3. Os cambios no perfil de expresión de microARNs ao longo do tratamento quimioterápico suxiren a súa utilidade como biomarcadores diagnósticos de cardiotoxicidade subclínica.
4. A análise *in silico* mostra unha aproximación das vías alteradas polos microARNs abrindo unha porta a estudos funcionais para tratar de esclarecer os mecanismos moleculares polos cales se desenvolve a cardiotoxicidade subclínica.
5. As diferencias na expresión de adipokinas poderían xustificar a diferente predisposición a desenvolver cardiotoxicidade subclínica e ter un papel diagnóstico da mesma.
6. A omentina contrarresta o dano por docetaxel, previndo a aparición do estrés do retículo endoplasmático, suxerindo que o tratamento con omentina pode contribuír a diminuír a susceptibilidade á cardiotoxicidade inducida por docetaxel.
5. A omentina circulante pode desenvolver un papel cardioprotector fronte á cardiotoxicidade por quimioterapia en pacientes con cancro de mama.



# BIBLIOGRAFÍA







## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

1. Sung, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* (2021) doi:10.3322/caac.21660.
2. Gernaat, S. A. M. *et al.* Risk of death from cardiovascular disease following breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res. Treat.* **164**, 537–555 (2017).
3. Nardin, S. *et al.* Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities. *Frontiers in Oncology* vol. 10 (2020).
4. Lipshultz, S. E. *et al.* Long-term cardiovascular toxicity in children, adolescents, and young adults who receive cancer therapy: Pathophysiology, course, monitoring, management, prevention, and research directions: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **128**, 1927–1955 (2013).
5. Caro-Codón, J. *et al.* Cardiovascular risk factors during cancer treatment. Prevalence and prognostic relevance: insights from the CARDIOTOX registry. *Eur. J. Prev. Cardiol.* (2020) doi:10.1093/eurjpc/zwaa034.
6. Lyon, A. R. *et al.* Baseline cardiovascular risk assessment in cancer patients scheduled to receive cardiotoxic cancer therapies: a position statement and new risk assessment tools from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in collaboration with the International Cardio-Oncology Society. *Eur. J. Heart Fail.* **22**, 1945–1960 (2020).
7. López-Sendón, J. *et al.* Classification , prevalence , and outcomes of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: the CARDIOTOX registry. 1–12 (2020) doi:10.1093/eurheartj/ehaa006.
8. Zamorano, J. L. *et al.* 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. *European Heart Journal* vol. 37 2768–2801 (2016).
9. Anampa, J., Makower, D. & Sparano, J. A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: An overview. *BMC Medicine* vol. 13 1–13 (2015).
10. Chen, D. H. *et al.* Cardiovascular Disease Amongst Women Treated for Breast Cancer: Traditional Cytotoxic Chemotherapy, Targeted Therapy, and Radiation Therapy. *Curr. Cardiol. Rep.* **23**, 1–9 (2021).
11. Mehta, L. S. *et al.* Cardiovascular Disease and Breast Cancer: Where These Entities Intersect: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **137**, e30–e66 (2018).

12. Renu, K., V.G., A., Tirupathi, T. P. & Arunachalam, S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *European Journal of Pharmacology* vol. 818 241–253 (2018).
13. Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L. & McMullen, J. R. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Archives of Toxicology* vol. 89 1401–1438 (2015).
14. Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T. & Leeuwenburgh, C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res.* **62**, 4592–4598 (2002).
15. Zhang, S. *et al.* Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.* **18**, 1639–1642 (2012).
16. Wang, X. Y. *et al.* Hydrogen sulfide protects H9c2 cells against doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biochem.* **363**, 419–426 (2012).
17. Felker, G. M. *et al.* Underlying Causes and Long-Term Survival in Patients with Initially Unexplained Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1077–1084 (2000).
18. Steinherz, L. J., Steinherz, P. G., Tan, C. T. C., Heller, G. & Murphy, M. L. Cardiac Toxicity 4 to 20 Years After Completing Anthracycline Therapy. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **266**, 1672–1677 (1991).
19. Sawyer, D. B., Peng, X., Chen, B., Pentassuglia, L. & Lim, C. C. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: Can we identify strategies for cardioprotection? *Prog. Cardiovasc. Dis.* **53**, 105–113 (2010).
20. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. & Mcphail, A. T. Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*2. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325–2327 (1971).
21. Olsen, S. R. Taxanes and COX-2 inhibitors: From molecular pathways to clinical practice. *Biomed. Pharmacother.* **59**, (2005).
22. Kitamura, N., Sakamoto, K., Ono, T. & Kimura, J. THE INHIBITORY EFFECT OF PACLITAXEL ON (Kv2.1) K+ CURRENT IN H9c2 CELLS. *Fukushima J. Med. Sci.* **61**, 47–53 (2015).
23. Yeh, E. T. H. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation* **109**, 3122–3131 (2004).
24. Floyd, J. D. *et al.* Cardiotoxicity of cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* vol. 23 7685–7696 (2005).
25. Rohena, C. C. & Mooberry, S. L. Recent progress with microtubule stabilizers: new compounds, binding modes and cellular activities. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 335 (2014).
26. Gundersen, G. G. & Cook, T. A. Microtubules and signal transduction MT. *Curr. Opin. Cell Biol.* 81–94 (1999).

27. Ogura, T., Tanaka, Y., Tamaki, H. & Harada, M. Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptotic caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells. *Int. J. Oncol.* **48**, 2330–2338 (2016).
28. Hickson, J. *et al.* Noninvasive molecular imaging of apoptosis in vivo using a modified firefly luciferase substrate, Z-DEVD-aminoluciferin. *Cell Death Differ.* **17**, 1003–1010 (2010).
29. Stork, C. M. & Schreffler, S. M. Cyclophosphamide. in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* 1111–1113 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00720-X.
30. Iqbal, A. *et al.* Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sciences* vol. 218 112–131 (2019).
31. Goldberg, M. A., Antin, J. H., Guinan, E. C. & Rapoport, J. M. Cyclophosphamide cardiotoxicity: An analysis of dosing as a risk factor. *Blood* **68**, 1114–1118 (1986).
32. Diasio, R. B. & Harris, B. E. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics* vol. 16 215–237 (1989).
33. Masuda, N. *et al.* Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2147–2159 (2017).
34. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* vol. 3 330–338 (2003).
35. Senkus, E. & Jassem, J. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* vol. 37 300–311 (2011).
36. Schimmel, K. J. M., Richel, D. J., van den Brink, R. B. A. & Guchelaar, H. J. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat. Rev.* **30**, 181–191 (2004).
37. Kreutzfeldt, J., Rozeboom, B., Dey, N. & De, P. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 1045–1067 (2020).
38. Vu, T. & Claret, F. X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front. Oncol.* **2**, 62 (2012).
39. Nami, B., Maadi, H. & Wang, Z. Mechanisms underlying the action and synergism of trastuzumab and pertuzumab in targeting HER2-positive breast cancer. *Cancers* vol. 10 (2018).
40. Hedhli, N. & S. Russell, K. Cardiotoxicity of Molecularly Targeted Agents. *Curr. Cardiol. Rev.* **7**, 221–233 (2012).
41. Jiang, J., Mohan, N., Endo, Y., Shen, Y. & Wu, W. J. Type IIB DNA topoisomerase is downregulated by trastuzumab and doxorubicin to synergize cardiotoxicity. **9**, 6095–6108 (2018).
42. Mohan, N., Jiang, J., Dokmanovic, M. & Wu, W. J. Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers. *Antib. Ther.* **1**, 13–17 (2018).
43. Darby, S. *et al.* Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual

- patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**, 1707–1716 (2011).
44. McGale, P. *et al.* Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* **383**, 2127–2135 (2014).
  45. Martín García, A. *et al.* Stratification and management of cardiovascular risk in cancer patients. A consensus document of the SEC, FEC, SEOM, SEOR, SEHH, SEMG, AEEMT, AECC, and AECC. *Rev. Esp. Cardiol.* **74**, 438–448 (2021).
  46. Desai, M. Y. *et al.* Prevention, Diagnosis, and Management of Radiation-Associated Cardiac Disease: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 74 905–927 (2019).
  47. Díaz-Gavela, A. A. *et al.* Breast radiotherapy-related cardiotoxicity. When, how, why. risk prevention and control strategies. *Cancers* vol. 13 1712 (2021).
  48. Wouters, K. A., Kremer, L. C. M., Miller, T. L., Herman, E. H. & Lipshultz, S. E. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: A review of the most promising strategies. *British Journal of Haematology* vol. 131 561–578 (2005).
  49. Chemotherapy-related Heart Failure | OncologyPRO. <https://oncologypro.esmo.org/education-library/esmo-handbooks/oncological-emergencies/chemotherapy-related-heart-failure>.
  50. Curigliano, G. *et al.* Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 309–325 (2016).
  51. Plana, J. C. *et al.* Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: A report from the American society of echocardiography and the European association of cardiovascular imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **27**, 911–939 (2014).
  52. Ewer, M. S. & Lenihan, D. J. Left ventricular ejection fraction and cardiotoxicity: Is our ear really to the ground? *Journal of Clinical Oncology* vol. 26 1201–1203 (2008).
  53. Kosaraju, A., Goyal, A., Grigorova, Y. & Makaryus, A. N. *Left Ventricular Ejection Fraction. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
  54. Truong, J., Yan, A. T., Cramarossa, G. & Chan, K. K. W. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: Detection, prevention, and management. *Canadian Journal of Cardiology* vol. 30 869–878 (2014).
  55. Laufer-Perl, M., Gilon, D., Kapusta, L. & Iakobishvili, Z. The Role of Speckle Strain Echocardiography in the Diagnosis of Early Subclinical Cardiac Injury in Cancer Patients—Is There More Than Just Left Ventricle Global Longitudinal Strain? *J. Clin. Med.* **10**, 154 (2021).
  56. Cardinale, D. *et al.* Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. Clinical Relevance and Response to Pharmacologic Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 213–220 (2010).

57. Plana, J. C., Fernández Lopez, T., Gómez de Diego, J. J. & García Fernández, M. Á. *Cardio Oncology*. (2015).
58. Potter, E. & Marwick, T. H. Assessment of Left Ventricular Function by Echocardiography: The Case for Routinely Adding Global Longitudinal Strain to Ejection Fraction. *JACC: Cardiovascular Imaging* vol. 11 260–274 (2018).
59. Global Longitudinal Strain for LV Function - American College of Cardiology. <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/ten-points-to-remember/2018/08/10/11/01/assessment-of-left-ventricular-global-longitudinal-strain>.
60. Thavendiranathan, P. *et al.* Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: A systematic review. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 63 2751–2768 (2014).
61. Sawaya, H. *et al.* Early detection and prediction of cardiotoxicity in chemotherapy-treated patients. *Am. J. Cardiol.* **107**, 1375–1380 (2011).
62. Gripp, E. de A. *et al.* Global longitudinal strain accuracy for cardiotoxicity prediction in a cohort of breast cancer patients during anthracycline and/or trastuzumab treatment. *Arq. Bras. Cardiol.* **110**, 140–150 (2018).
63. Negishi, T. *et al.* Cardioprotection using strain-guided management of potentially cardiotoxic cancer therapy: 1 year results of the SUCCOUR trial. *Eur. Heart J.* **41**, (2020).
64. Thavendiranathan, P. *et al.* Strain-Guided Management of Potentially Cardiotoxic Cancer Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **77**, 392–401 (2021).
65. Negishi, K. *et al.* Independent and incremental value of deformation indices for prediction of trastuzumab-induced cardiotoxicity. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **26**, 493–498 (2013).
66. Arévalo Guerrero, E. & Restrepo Molina, G. The role of myocardial strain imaging in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Rev. Colomb. Cardiol.* **26**, 86–90 (2019).
67. Cardinale Daniela, D. & Sandri, M. T. Role of biomarkers in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **53**, 121–129 (2010).
68. Gai, W. *et al.* Research progress of biomarkers in early detection of chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Heart Fail. Rev.* (2020) doi:10.1007/s10741-020-09948-6.
69. Bouwer, N. I. *et al.* NT-proBNP correlates with LVEF decline in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab. *Cardio-Oncology* **5**, (2019).
70. Michel, L., Rassaf, T. & Totzeck, M. Biomarkers for the detection of apparent and subclinical cancer therapy-related cardiotoxicity. *Journal of Thoracic Disease* vol. 10 S4282–S4295 (2018).
71. Reichlin, T. *et al.* Early Diagnosis of Myocardial Infarction with Sensitive Cardiac Troponin Assays. *N. Engl. J. Med.* **361**, 858–867 (2009).
72. Cardinale, D., Biasillo, G., Salvatici, M., Sandri, M. T. & Cipolla, C. M. Using

- biomarkers to predict and to prevent cardiotoxicity of cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **17**, 245–256 (2017).
73. Cardinale, D. *et al.* Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 517–522 (2000).
  74. Cardinale, D. *et al.* Trastuzumab-induced cardiotoxicity: Clinical and prognostic implications of troponin I evaluation. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3910–3916 (2010).
  75. Armenian, S. H. *et al.* Screening for cardiac dysfunction in anthracycline-exposed childhood cancer survivors. *Clin. Cancer Res.* **20**, 6314–6323 (2014).
  76. Sherief, L. M. *et al.* Biomarkers and early detection of late onset anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Hematology* **17**, 151–156 (2012).
  77. Ponde, N. *et al.* Cardiac biomarkers for early detection and prediction of trastuzumab and/or lapatinib-induced cardiotoxicity in patients with HER2-positive early-stage breast cancer: a NeoALTTO sub-study (BIG 1-06). *Breast Cancer Res. Treat.* **168**, 631–638 (2018).
  78. Kitayama, H. *et al.* High-sensitive troponin T assay can predict anthracycline- and trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Breast Cancer* **24**, 774–782 (2017).
  79. Kang, Y. *et al.* Two-dimensional speckle tracking echocardiography combined with high-sensitive cardiac troponin T in early detection and prediction of cardiotoxicity during epirubicin-based chemotherapy. *Eur. J. Heart Fail.* **16**, 300–308 (2014).
  80. Tan, L.-L. & Lyon, A. R. Role of Biomarkers in Prediction of Cardiotoxicity During Cancer Treatment. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **20**, 55 (2018).
  81. Weber, M. & Hamm, C. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-PROBNP in clinical routine. *Heart* vol. 92 843–849 (2006).
  82. Nakagawa, Y., Nishikimi, T. & Kuwahara, K. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. *Peptides* vol. 111 18–25 (2019).
  83. Suzuki, T. *et al.* Elevated B-type natriuretic peptide levels after anthracycline administration. *Am. Heart J.* **136**, 362–363 (1998).
  84. De Iuliis, F. *et al.* Serum biomarkers evaluation to predict chemotherapy-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Tumor Biol.* **37**, 3379–3387 (2016).
  85. Mladosievicova, B., Urbanova, D., Radvanska, E., Slavkovsky, P. & Simkova, I. Role of NT-proBNP in detection of myocardial damage in childhood leukemia survivors treated with and without anthracyclines. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 1–6 (2012).
  86. Ruggiero, A. *et al.* Myocardial performance index and biochemical markers for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Int. J. Clin. Oncol.* **18**, 927–933 (2013).



87. Bando, S. *et al.* Plasma brain natriuretic peptide levels are elevated in patients with cancer. *PLoS One* **12**, (2017).
88. Ky, B. *et al.* Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 809–816 (2014).
89. Ananthan, K. & Lyon, A. R. The Role of Biomarkers in Cardio-Oncology. *Journal of Cardiovascular Translational Research* vol. 13 431–450 (2020).
90. Holmgren, G., Synnergren, J., Andersson, C. X., Lindahl, A. & Sartipy, P. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Vitro.* **34**, 26–34 (2016).
91. Leger, K. J. *et al.* Circulating microRNAs: Potential Markers of Cardiotoxicity in Children and Young Adults Treated With Anthracycline Chemotherapy. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, (2017).
92. Rigaud, V. O.-C. *et al.* Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Oncotarget* **8**, 6994–7002 (2017).
93. Stoltzfus, K. C. *et al.* Fatal heart disease among cancer patients. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
94. Campbell, K. L. *et al.* Exercise Guidelines for Cancer Survivors: Consensus Statement from International Multidisciplinary Roundtable. *Med. Sci. Sports Exerc.* **51**, 2375–2390 (2019).
95. Segal, R. *et al.* Exercise for people with cancer: A clinical practice guideline. *Curr. Oncol.* **24**, 40–46 (2017).
96. Cormie, P., Zopf, E. M., Zhang, X. & Schmitz, K. H. The impact of exercise on cancer mortality, recurrence, and treatment-related adverse effects. *Epidemiol. Rev.* **39**, 71–92 (2017).
97. Ginzac, A. *et al.* Treatment-Induced Cardiotoxicity in Breast Cancer: A Review of the Interest of Practicing a Physical Activity. *Oncology (Switzerland)* vol. 96 223–234 (2019).
98. Díaz-Balboa, E. *et al.* A randomized trial to evaluate the impact of exercise-based cardiac rehabilitation for the prevention of chemotherapy-induced cardiotoxicity in patients with breast cancer: ONCORE study protocol. *BMC Cardiovasc. Disord.* **21**, (2021).
99. Jones, L. W. *et al.* Exercise and Risk of cardiovascular events in women with nonmetastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2743–2749 (2016).
100. Kavazis, A. N., McClung, J. M., Hood, D. A. & Powers, S. K. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **294**, (2008).
101. Beck, R. E. *et al.* Treatment techniques to reduce cardiac irradiation for breast cancer patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy: A review. *Frontiers in Oncology* vol. 4 327 (2014).
102. Holmes, D. R. Intraoperative radiotherapy of the breast for early-stage breast cancer: Ready for primetime. *Breast J.* **21**, 181–184 (2015).
103. van Dalen, E. C., Michiels, E. M. C., Caron, H. N. & Kremer, L. C. M.



- Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2010 (2010).
104. Rafiyath, S. M. *et al.* Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp. Hematol. Oncol.* **1**, 10 (2012).
  105. Armenian, S. H. *et al.* Prevention and monitoring of cardiac dysfunction in survivors of adult cancers: American society of clinical oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology* vol. 35 893–911 (2017).
  106. Yi, L. L. *et al.* Topoisomerase II $\beta$ -mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res.* **67**, 8839–8846 (2007).
  107. QuanJun, Y. *et al.* Protective effects of dexrazoxane against doxorubicin-induced cardiotoxicity: A metabolomic study. *PLoS One* **12**, 1–18 (2017).
  108. Curigliano, G. *et al.* Management of cardiac disease in cancer patients throughout oncological treatment: ESMO consensus recommendations. *Ann. Oncol.* **31**, 171–190 (2020).
  109. Padegimas, A., Clasen, S. & Ky, B. Cardioprotective strategies to prevent breast cancer therapy-induced cardiotoxicity. *Trends in Cardiovascular Medicine* vol. 30 22–28 (2020).
  110. Kimball, T. H. & Vondriska, T. M. Metabolism, Epigenetics, and Causal Inference in Heart Failure. *Trends in Endocrinology and Metabolism* vol. 31 181–191 (2020).
  111. Kumari, H., Huang, W.-H. & Chan, M. W. Y. Review on the Role of Epigenetic Modifications in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, 56 (2020).
  112. Ferreira, A. *et al.* Altered mitochondrial epigenetics associated with subchronic doxorubicin cardiotoxicity. *Toxicology* **390**, 63–73 (2017).
  113. Piotrowska, I., Isalan, M. & Mielcarek, M. Early transcriptional alteration of histone deacetylases in a murine model of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *PLoS One* **12**, (2017).
  114. Song, R. *et al.* HDAC6 inhibition protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced acute damage by improving  $\alpha$ -tubulin acetylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **124**, 58–69 (2018).
  115. Silva, D. C. P. da, Carneiro, F. D., Almeida, K. C. de & Fernandes-Santos, C. Role of miRNAs on the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Arq. Bras. Cardiol.* **111**, 738–746 (2018).
  116. Viereck, J. & Thum, T. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ. Res.* **120**, 381–399 (2017).
  117. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 6 376–385 (2005).
  118. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology* vol. 9 402 (2018).
  119. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals.

- Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 10 126–139 (2009).
120. Kamal, N. N. S. B. N. M. & Shahidan, W. N. S. Non-exosomal and exosomal circulatory MicroRNAs: Which are more valid as biomarkers? *Frontiers in Pharmacology* vol. 10 (2020).
  121. Iguchi, H., Kosaka, N. & Ochiya, T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun. Integr. Biol.* **3**, 478–481 (2010).
  122. Hayes, J., Peruzzi, P. P. & Lawler, S. MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine* vol. 20 460–469 (2014).
  123. Zampetaki, A., Willeit, P., Drozdov, I., Kiechl, S. & Mayr, M. Profiling of circulating microRNAs: From single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovascular Research* vol. 93 555–562 (2012).
  124. Mosallaei, M. *et al.* PBMCs: a new source of diagnostic and prognostic biomarkers. *Arch. Physiol. Biochem.* **0**, 1–7 (2020).
  125. Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **18**, 997–1006 (2008).
  126. Bartels, C. L. & Tsongalis, G. J. Mini-reviews micrornas: novel biomarkers for human cancer. *Clin. Chem.* **55**, 623–631 (2009).
  127. Gilad, S. *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* **3**, (2008).
  128. Hoekstra, M. *et al.* The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 792–797 (2010).
  129. Voellenkle, C. *et al.* MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol. Genomics* **42**, 420–426 (2010).
  130. Huang, H. *et al.* Novel blood biomarkers of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus identified by peripheral blood-based gene expression profiles. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 1661–1669 (2010).
  131. Liew, C. C., Ma, J., Tang, H. C., Zheng, R. & Dempsey, A. A. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: A potential diagnostic tool. *J. Lab. Clin. Med.* **147**, 126–132 (2006).
  132. Meier, S., Henkens, M., Heymans, S. & Robinson, E. L. Unlocking the Value of White Blood Cells for Heart Failure Diagnosis. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **14**, 53–62 (2021).
  133. Zeng, X. L., Zhang, S. Y., Zheng, J. F., Yuan, H. & Wang, Y. Altered miR-143 and miR-150 expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Chin. Med. J. (Engl)*. **126**, 4510–4516 (2013).
  134. Yang, Y. L., Xu, L. P., Zhuo, F. L. & Wang, T. Y. Prognostic value of microRNA-10b overexpression in peripheral blood mononuclear cells of nonsmall-cell lung cancer patients. *Tumor Biol.* **36**, 7069–7075 (2015).
  135. Zampetaki, A. & Mayr, M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circulation Research* vol. 110 508–522 (2012).
  136. Makkos, A. *et al.* Systematic review and network analysis of microRNAs

- involved in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury and infarction: involvement of redox signalling. *Free Radic. Biol. Med.* (2021) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.034.
137. Gupta, S. K., Bang, C. & Thum, T. Circulating MicroRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics* vol. 3 484–488 (2010).
  138. D'Alessandra, Y. *et al.* Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **31**, 2765–2773 (2010).
  139. Ji, X. *et al.* Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin. Chem.* **55**, 1944–1949 (2009).
  140. Van Rooij, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13027–13032 (2008).
  141. Yang, Y., Ding, S., Xu, G., Chen, F. & Ding, F. MicroRNA-15a inhibition protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by targeting mothers against decapentaplegic homolog 7. *Mol. Med. Rep.* **15**, 3699–3705 (2017).
  142. Tian, Z. Q., Jiang, H. & Lu, Z. B. MiR-320 regulates cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia–reperfusion injury by targeting AKIP1. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **23**, (2018).
  143. Carè, A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **13**, 613–618 (2007).
  144. Sabbah, H. N. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovascular Research* vol. 45 704–712 (2000).
  145. Oliveira-Carvalho, V., Silva, M. M. F. Da, Guimarães, G. V., Bacal, F. & Bocchi, E. A. MicroRNAs: New players in heart failure. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 2663–2670 (2013).
  146. Yang, B. *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat. Med.* **13**, 486–491 (2007).
  147. Li, Y. D. *et al.* Altered expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and -133 in patients with age-associated atrial fibrillation. *Mol. Med. Rep.* **12**, 3243–3248 (2015).
  148. Yin, Z. *et al.* miR-320a mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity by targeting VEGF signal pathway. *Aging (Albany. NY).* **8**, 192–207 (2016).
  149. Nishimura, Y. *et al.* Plasma miR-208 as a useful biomarker for drug-induced cardiotoxicity in rats. *J. Appl. Toxicol.* **35**, 173–180 (2015).
  150. Frères, P. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression. *J. Cell. Physiol.* **230**, 473–481 (2015).
  151. Skála, M., Hanousková, B., Skálová, L. & Matoušková, P. MicroRNAs in the diagnosis and prevention of drug-induced cardiotoxicity. *Arch. Toxicol.* **93**, 1–9 (2019).
  152. Ruggeri, C., Gioffré, S., Achilli, F., Colombo, G. I. & D'Alessandra, Y. Role of microRNAs in doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview of

- preclinical models and cancer patients. *Heart Fail. Rev.* **23**, 109–122 (2018).
153. Pereira, J. D. *et al.* microRNAs associated to anthracycline-induced cardiotoxicity in women with breast cancer: A systematic review and pathway analysis. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 131 (2020).
  154. D'Alessandra, Y. Early diagnosis of doxorubicin-induced cardiotoxicity: The miRNA way. *Cardiovasc. Disord. Med.* **2**, (2017).
  155. Mahmood, S. S., Levy, D., Vasan, R. S. & Wang, T. J. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: A historical perspective. *The Lancet* vol. 383 999–1008 (2014).
  156. Wang, Y. X. *et al.* Friend or foe: Multiple roles of adipose tissue in cancer formation and progression. *Journal of Cellular Physiology* vol. 234 21436–21449 (2019).
  157. Arnold, M. *et al.* Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: A population-based study. *Lancet Oncol.* **16**, 36–46 (2015).
  158. Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. & Thun, M. J. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1625–1638 (2003).
  159. Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R. & Slingerland, J. M. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 378–397 (2017).
  160. De Azambuja, E. *et al.* The effect of body mass index on overall and disease-free survival in node-positive breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin-containing adjuvant chemotherapy: The experience of the BIG 02-98 trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **119**, 145–153 (2010).
  161. Brown, S. A., Sandhu, N. & Herrmann, J. Systems biology approaches to adverse drug effects: The example of cardio-oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 12 718–731 (2015).
  162. Cueva, J. F. *et al.* Galician consensus on management of cardiotoxicity in breast cancer: risk factors, prevention, and early intervention. *Clin. Transl. Oncol.* **19**, 1067–1078 (2017).
  163. Duarte, C. W., Lindner, V., Francis, S. A. & Schoormans, D. Visualization of Cancer and Cardiovascular Disease Co-Occurrence With Network Methods. *JCO Clin. Cancer Informatics* **1**, 1–12 (2017).
  164. Rodvold, K. A., Rushing, D. A. & Tewksbury, D. A. Doxorubicin clearance in the obese. *J. Clin. Oncol.* **6**, 1321–1327 (1988).
  165. Mitra, M. S., Donthamsetty, S., White, B. & Mehendale, H. M. High fat diet-fed obese rats are highly sensitive to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **231**, 413–422 (2008).
  166. Guenancia, C. *et al.* Overweight in mice, induced by perinatal programming, exacerbates doxorubicin and trastuzumab cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 777–785 (2016).
  167. Guenancia, C. *et al.* Obesity as a risk factor for anthracyclines and trastuzumab cardiotoxicity in breast cancer: A systematic review and meta-

- analysis. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3157–3165 (2016).
168. Feijóo-Bandín, S. *et al.* Adipokines and inflammation: Focus on cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 1–34 (2020).
  169. Crewe, C., An, Y. A. & Scherer, P. E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: Inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* vol. 127 74–82 (2017).
  170. Kim, N. H., Jung, Y. S., Park, J. H., Park, D. Il & Sohn, C. Il. Influence of Obesity and Metabolic Abnormalities on the Risk of Developing Colorectal Neoplasia. *Dig. Dis. Sci.* **63**, 3126–3133 (2018).
  171. Maruyama, S. *et al.* Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 32790–32800 (2011).
  172. Kazama, K., Okada, M. & Yamawaki, H. Adipocytokine, omentin inhibits doxorubicin-induced H9c2 cardiomyoblasts apoptosis through the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 602–607 (2015).
  173. Dirat, B. *et al.* Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* **71**, 2455–2465 (2011).
  174. De Souza Batista, C. M. *et al.* Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* **56**, 1655–1661 (2007).
  175. Fernández-Trasancos, Á. *et al.* Omentin treatment of epicardial fat improves its anti-inflammatory activity and paracrine benefit on smooth muscle cells. *Obesity* **25**, 1042–1049 (2017).
  176. Yildiz, S. S. *et al.* Usefulness of Serum Omentin-1 Levels for the Prediction of Adverse Cardiac Events in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Med. Princ. Pract.* **27**, 107–114 (2018).
  177. Wang, X. H., Dou, L. Z., Gu, C. & Wang, X. Q. Plasma levels of omentin-1 and visfatin in senile patients with coronary heart disease and heart failure. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **7**, 55–62 (2014).
  178. Narumi, T. *et al.* Impact of serum omentin-1 levels on cardiac prognosis in patients with heart failure. *Cardiovasc. Diabetol.* **13**, (2014).
  179. Huang, Y. *et al.* Circulating Omentin-1 Levels Are Decreased in Dilated Cardiomyopathy Patients with Overt Heart Failure. *Dis. Markers* **2016**, (2016).
  180. Biscetti, F. *et al.* Association between plasma omentin-1 levels in type 2 diabetic patients and peripheral artery disease. *Cardiovasc. Diabetol.* **18**, (2019).
  181. Baig, M., Alghalayini, K. W., Gazzaz, Z. J. & Atta, H. Association of serum omentin-1, chemerin, and leptin with acute myocardial infarction and its risk factors. *Pakistan J. Med. Sci.* **36**, 1–6 (2020).
  182. Kadoglou, N. P. E. *et al.* Serum levels of novel adipokines, omentin-1 and chemerin, in patients with acute myocardial infarction: KOZANI STUDY. *J. Cardiovasc. Med.* **16**, 341–346 (2015).

183. Kataoka, Y. *et al.* Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMP-activated protein kinase- and akt-dependent mechanisms. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 2722–2733 (2014).
184. Matsuo, K. *et al.* Omentin functions to attenuate cardiac hypertrophic response. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **79**, 195–202 (2015).
185. Tahmasebpour, N. *et al.* Association of omentin-1 with oxidative stress and clinical significances in patients with breast cancer. *Adv. Pharm. Bull.* **10**, 106–113 (2020).
186. Yanai, H. & Yoshida, H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: Mechanisms and perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
187. Rybinska, I., Mangano, N., Tagliabue, E. & Triulzi, T. Cancer-Associated Adipocytes in Breast Cancer: Causes and Consequences. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
188. Piñeiro, R. *et al.* Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* **579**, 5163–5169 (2005).
189. Konishi, M. *et al.* Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation. *Cardiovasc. Res.* **89**, 309–319 (2011).
190. Zhao, D. *et al.* Adiponectin agonist ADP355 ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by decreasing cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **533**, 304–312 (2020).
191. Frunza, O. *et al.* Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. *Am. J. Pathol.* **186**, 1114–1127 (2016).
192. Çay, T. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: A review of the literature. *Turk Patoloji Dergisi/Turkish J. Pathol.* **28**, 1–10 (2012).
193. Boutas, I. *et al.* The expression of Galectin-3 in breast cancer and its association with metastatic disease: a systematic review of the literature. *Molecular Biology Reports* vol. 48 807–815 (2021).
194. Berezin, A. E. Prognostication in Different Heart Failure Phenotypes: The Role of Circulating Biomarkers. *Journal of Circulating Biomarkers* vol. 5 (2016).
195. Lv, W. *et al.* Galectin-3 inhibition attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction by upregulating the expression of peroxiredoxin-4. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **98**, 700–707 (2020).
196. Furuhashi, M. Fatty acid-binding protein 4 in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* vol. 26 216–232 (2019).
197. Egbuche, O. *et al.* Fatty Acid Binding Protein-4 and Risk of Cardiovascular Disease: The Cardiovascular Health Study. *J. Am. Heart Assoc.* **9**, e014070 (2020).
198. Tsakogiannis, D. *et al.* Determination of FABP4, RBP4 and the MMP-9/NGAL complex in the serum of women with breast cancer. *Oncol. Lett.* **21**,



- (2020).
199. da Cunha Menezes Souza, L., Fernandes, F. H., Presti, P. T., Anjos Ferreira, A. L. & Fávero Salvadori, D. M. Effect of doxorubicin on cardiac lipid metabolism-related transcriptome and the protective activity of Alda-1. *Eur. J. Pharmacol.* **898**, (2021).
  200. Wu, D., Jiang, H., Chen, S. & Zhang, H. Inhibition of microRNA-101 attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis through induction of autophagy in H9c2 cardiomyocytes. *Mol. Med. Rep.* **11**, 3988–3994 (2015).
  201. Mayr, B. *et al.* Exercise responsive micro ribonucleic acids identify patients with coronary artery disease. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **26**, 348–355 (2019).
  202. Zhao, X. *et al.* MicroRNA-101 protects cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis via inhibition of the TGF- $\beta$  signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **65**, 155–164 (2015).
  203. Wei, L. *et al.* MicroRNA-101 inhibits rat cardiac hypertrophy by targeting Rab1a. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **65**, 357–363 (2015).
  204. Pan, Z. *et al.* MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor- $\beta$ 1 pathway. *Circulation* **126**, 840–850 (2012).
  205. Sukma Dewi, I. *et al.* Association of serum MiR-142-3p and MiR-101-3p levels with acute cellular rejection after heart transplantation. *PLoS One* **12**, (2017).
  206. Ruggeri, C. *et al.* A specific circulating MicroRNA cluster is associated to late differential cardiac response to doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo. *Dis. Markers* **2018**, (2018).
  207. Wang, S. S. *et al.* A meta-analysis of dysregulated miRNAs in coronary heart disease. *Life Sciences* vol. 215 170–181 (2018).
  208. Derda, A. A. *et al.* Blood-based microRNA profiling in patients with cardiac amyloidosis. *PLoS One* **13**, (2018).
  209. Gilje, P. *et al.* The association between plasma miR-122-5p release pattern at admission and all-cause mortality or shock after out-of-hospital cardiac arrest. *Biomarkers* **24**, 29–35 (2019).
  210. Devaux, Y. *et al.* Incremental value of circulating MiR-122-5P to predict outcome after out of hospital cardiac arrest. *Theranostics* **7**, 2555–2564 (2017).
  211. Cortez-Dias, N. *et al.* Circulating miR-122-5p/miR-133B ratio is a specific early prognostic biomarker in acute myocardial infarction. *Circ. J.* **80**, 2183–2191 (2016).
  212. Liu, X. *et al.* Differential microRNA expression and regulation in the rat model of post-infarction heart failure. *PLoS One* **11**, 1–18 (2016).
  213. Marques, F. Z., Vizi, D., Khammy, O., Mariani, J. A. & Kaye, D. M. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur. J. Heart Fail.* **18**, 1000–1008 (2016).
  214. Braza-Boïls, A. *et al.* Dereglated hepatic microRNAs underlie the

- association between non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *Liver Int.* **36**, 1221–1229 (2016).
215. Liu, B. lei *et al.* Overexpression of miR-142-3p improves mitochondrial function in cardiac hypertrophy. *Biomed. Pharmacother.* **108**, 1347–1356 (2018).
  216. Wang, Y., Ouyang, M., Wang, Q. & Jian, Z. MicroRNA-142-3p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and fibrosis of cardiomyocytes by targeting high mobility group box 1. *Int. J. Mol. Med.* **38**, 1377–1386 (2016).
  217. Toro, R. *et al.* Plasma microRNAs as biomarkers for Lamin A/C-related dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Med.* **96**, 845–856 (2018).
  218. Ellis, K. L. *et al.* Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur. J. Heart Fail.* **15**, 1138–1147 (2013).
  219. Nair, N., Kumar, S., Gongora, E. & Gupta, S. Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol. Cell. Biochem.* **376**, 33–40 (2013).
  220. Bye, A. *et al.* Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **97**, 162–168 (2016).
  221. Ye, Y. *et al.* Screening of differentially expressed microRNAs of essential hypertension in Uyghur population. *Lipids Health Dis.* **18**, (2019).
  222. Yamada, S. *et al.* Circulating microRNAs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with ventricular arrhythmia. *Europace* **20**, f37–f45 (2018).
  223. Yi, F. *et al.* MicroRNA-193-5p modulates angiogenesis through IGF2 in type 2 diabetic cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**, 876–882 (2017).
  224. Fang, L. *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Transl. Med.* **13**, (2015).
  225. Wang, J. *et al.* MicroRNA profiling in the left atrium in patients with non-valvular paroxysmal atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc. Disord.* **15**, (2015).
  226. Wang, S. *et al.* HSF1 deficiency accelerates the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure through endothelial miR-195a-3p-mediated impairment of cardiac angiogenesis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **118**, 193–207 (2018).
  227. He, X., Ji, J., Wang, T., Wang, M. B. & Chen, X. L. Upregulation of Circulating miR-195-3p in Heart Failure. *Cardiol.* **138**, 107–114 (2017).
  228. Liu, K. *et al.* Identification of microRNAs related to myocardial ischemic reperfusion injury. *J. Cell. Physiol.* **234**, 11380–11390 (2019).
  229. Nie, L. *et al.* MiR-20 regulates myocardial ischemia by targeting KATP subunit Kir6.1. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* **37**, 486–490 (2017).
  230. Onrat, S. T., Onrat, E., Ercan Onay, E., Yallm, Z. & Avsar, A. The genetic determination of the differentiation between ischemic dilated cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **22**, 644–651 (2018).



231. Altered Plasma MicroRNA Expression in Patients with Mitral Chordae Tendineae Rupture - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28238240/>.
232. Wang, D. *et al.* MicroRNA-20a participates in the aerobic exercise-based prevention of coronary artery disease by targeting PTEN. *Biomed. Pharmacother.* **95**, 756–763 (2017).
233. Liu, J. *et al.* MicroRNA-32 promotes calcification in vascular smooth muscle cells: Implications as a novel marker for coronary artery calcification. *PLoS One* **12**, (2017).
234. Hou, J. *et al.* Circulating microRNA profiles differ between Qi-stagnation and Qi-deficiency in coronary heart disease patients with blood stasis syndrome. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2014**, (2014).
235. Lin, F. *et al.* CircRNA-miRNA association for coronary heart disease. *Mol. Med. Rep.* **19**, 2527–2536 (2019).
236. Thum, T. *et al.* MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* **116**, 258–267 (2007).
237. Li, D., Zhou, J., Yang, B. & Yu, Y. microRNA-340-5p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress in cardiomyocytes by regulating the Act1/NF- $\kappa$ B pathway. *J. Cell. Biochem.* **120**, 14618–14627 (2019).
238. Zhou, J. *et al.* microRNA-340-5p functions downstream of cardiotrophin-1 to regulate cardiac eccentric hypertrophy and heart failure via target gene dystrophin. *Int. Heart J.* **56**, 454–458 (2015).
239. Mai, J. MicroRNAs and other mechanisms regulate interleukin-17 cytokines and receptors. *Front. Biosci.* **E4**, 1478 (2012).
240. Lee, J. S. *et al.* miR-374 promotes myocardial hypertrophy by negatively regulating vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling. *BMB Rep.* **50**, 208–213 (2017).
241. Doumatey, A. P. *et al.* Circulating MiR-374a-5p is a potential modulator of the inflammatory process in obesity. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
242. Zhang, S.-B. B. *et al.* MicroRNA-374 Exerts Protective Effects by Inhibiting SP1 Through Activating the PI3K/Akt Pathway in Rat Models of Myocardial Ischemia-Reperfusion after Sevoflurane Preconditioning. *Cell. Physiol. Biochem.* **46**, 1455–1470 (2018).
243. Harling, L. *et al.* Elevated serum microRNA 483-5p levels may predict patients at risk of post-operative atrial fibrillation. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **51**, 73–78 (2017).
244. Gallo, W., Esguerra, J. L. S., Eliasson, L. & Melander, O. miR-483-5p associates with obesity and insulin resistance and independently associates with new onset diabetes mellitus and cardiovascular disease. *PLoS One* **13**, (2018).
245. Li, S. *et al.* Circulating microRNAs as potential biomarkers for coronary plaque rupture. *Oncotarget* **8**, 48145–48156 (2017).
246. Nada Esa, J. A. W. Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-STSegment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction.

- Fam. Med. Med. Sci. Res.* **02**, (2013).
247. D'Alessandra, Y. *et al.* Diagnostic potential of plasmatic microRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One* **8**, (2013).
  248. Liu, H. *et al.* HAND2 loss-of-function mutation causes familial dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Med. Genet.* **62**, (2019).
  249. Ovchinnikova, E. S. *et al.* Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **18**, 414–423 (2016).
  250. Vegter, E. L. *et al.* Use of biomarkers to establish potential role and function of circulating microRNAs in acute heart failure. *Int. J. Cardiol.* **224**, 231–239 (2016).
  251. Wang, K. *et al.* Circular RNA mediates cardiomyocyte death via miRNA-dependent upregulation of MTP18 expression. *Cell Death Differ.* **24**, 1111–1120 (2017).
  252. Vegter, E. L. *et al.* Low circulating microRNA levels in heart failure patients are associated with atherosclerotic disease and cardiovascular-related rehospitalizations. *Clin. Res. Cardiol.* **106**, 598–609 (2017).
  253. Bruno, N. *et al.* MicroRNAs relate to early worsening of renal function in patients with acute heart failure. *Int. J. Cardiol.* **203**, 564–569 (2016).
  254. Kimes, B. W. & Brandt, B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* **98**, 367–381 (1976).
  255. Hung, C. H., Chan, S. H., Chu, P. M. & Tsai, K. L. Docetaxel facilitates endothelial dysfunction through oxidative stress via modulation of protein kinase C beta: The protective effects of sotrastaurin. *Toxicol. Sci.* **145**, 59–67 (2015).
  256. Florescu, D.-R. & Nistor, D.-E. Therapy-induced cardiotoxicity in breast cancer patients: a well-known yet unresolved problem. *Discoveries* **7**, e89 (2019).
  257. Healey Bird, B. R. J. & Swain, S. M. Cardiac toxicity in breast cancer survivors: Review of potential cardiac problems. *Clinical Cancer Research* vol. 14 14–24 (2008).
  258. Albini, A. *et al.* Cardiotoxicity of anticancer drugs: The need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 102 14–25 (2010).
  259. Čelutkienė, J. *et al.* Innovative imaging methods in heart failure: a shifting paradigm in cardiac assessment. Position statement on behalf of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur. J. Heart Fail.* **20**, 1615–1633 (2018).
  260. Di Lisi, D., Manno, G. & Novo, G. Subclinical Cardiotoxicity: The Emerging Role of Myocardial Work and Other Imaging Techniques. *Current Problems in Cardiology* vol. 46 100818 (2021).
  261. Gioffré, S. *et al.* Circulating MicroRNAs as Potential Predictors of Anthracycline-Induced Troponin Elevation in Breast Cancer Patients: Diverging Effects of Doxorubicin and Epirubicin. *J. Clin. Med.* **9**, 1418 (2020).

262. Wojciechowska, A., Braniewska, A. & Kozar-Kamińska, K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* **26**, 865–874 (2017).
263. Lage, R., Cebro-Márquez, M., Rodríguez-Mañero, M., González-Juanatey, J. R. & Moscoso, I. Omentin protects H9c2 cells against docetaxel cardiotoxicity. *PLoS One* **14**, (2019).
264. Yeh, E. T. H. & Bickford, C. L. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 2231–2247 (2009).
265. McGregor, P., Moura, F. A., Banchs, J. & Aragam, J. R. Role of myocardial strain imaging in surveillance and management of cancer therapeutics-related cardiac dysfunction: A systematic review. *Echocardiography* **38**, 314–328 (2021).
266. Negishi, T. *et al.* Rationale and Design of the Strain Surveillance of Chemotherapy for Improving Cardiovascular Outcomes: The SUCCOUR Trial. *JACC Cardiovasc. Imaging* **11**, 1098–1105 (2018).
267. Zhong, Z. *et al.* Circulating microRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs of patients with coronary artery disease. *Med. (United States)* **97**, (2018).
268. Chen, Z., Pan, X., Yan, G., Sheng, Z. & Ma, G. miR-142 is a sensitive biomarker for the diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Clin. Lab.* **66**, 1039–1044 (2020).
269. Liang, L. *et al.* MiR-142-3p enhances chemosensitivity of breast cancer cells and inhibits autophagy by targeting HMGB1. *Acta Pharm. Sin. B* **10**, 1036–1046 (2020).
270. Gao, G., Chen, W., Liu, M., Yan, X. & Yang, P. Circulating MicroRNAs as novel potential biomarkers for left ventricular remodeling in postinfarction heart failure. *Dis. Markers* **2019**, (2019).
271. Frank, D. *et al.* MicroRNA-20a inhibits stress-induced cardiomyocyte apoptosis involving its novel target Egln3/PHD3. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 711–717 (2012).
272. Zhang, P. *et al.* Circulating Exosomal miRNAs as Novel Biomarkers for Stable Coronary Artery Disease. *Biomed Res. Int.* **2020**, (2020).
273. Dai, Y., Yan, T. & Gao, Y. Silence of miR-32-5p promotes endothelial cell viability by targeting KLF2 and serves as a diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Diagn. Pathol.* **15**, (2020).
274. Shen, J. *et al.* MiR-32-5p influences high glucose-induced cardiac fibroblast proliferation and phenotypic alteration by inhibiting DUSP1. *BMC Mol. Biol.* **20**, 21 (2019).
275. Zhu, X. *et al.* Identification of micro-RNA networks in end-stage heart failure because of dilated cardiomyopathy. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 1173–1187 (2013).
276. Konstam, M. A., Kramer, D. G., Patel, A. R., Maron, M. S. & Udelson, J. E. Left ventricular remodeling in heart failure: Current concepts in clinical significance and assessment. *JACC: Cardiovascular Imaging* vol. 4 98–108 (2011).
277. Heusch, G. *et al.* Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and

- heart failure. *The Lancet* vol. 383 1933–1943 (2014).
278. Huang, Z. Q., Xu, W., Wu, J. L., Lu, X. & Chen, X. M. MicroRNA-374a protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by targeting the MAPK6 pathway. *Life Sci.* **232**, (2019).
  279. Brady, M. *et al.* Sp1 and Sp3 transcription factors are required for trans-activation of the human SERCA2 promoter in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **60**, 347–354 (2003).
  280. Santos-Faria, J. *et al.* MicroRNAs and ventricular remodeling in aortic stenosis. *Rev. Port. Cardiol.* **39**, 377–387 (2020).
  281. Wang, W., Ma, F. & Zhang, H. MicroRNA-374 is a potential diagnostic biomarker for atherosclerosis and regulates the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* **10**, 687–694 (2020).
  282. Matkovich, S. J., Hu, Y. & Dorn, G. W. Regulation of cardiac microRNAs by cardiac microRNAs. *Circ. Res.* **113**, 62–71 (2013).
  283. Bernardo, B. C. *et al.* Therapeutic silencing of miR-652 restores heart function and attenuates adverse remodeling in a setting of established pathological hypertrophy. *FASEB J.* **28**, 5097–5110 (2014).
  284. Shah, R. V. & Januzzi, J. L. ST2: A novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure. *Current Heart Failure Reports* vol. 7 9–14 (2010).
  285. Ikeda, S. *et al.* Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol. Genomics* **31**, 367–373 (2007).
  286. Koene, R. J., Prizment, A. E., Blaes, A. & Konety, S. H. Shared risk factors in cardiovascular disease and cancer. *Circulation* **133**, 1104–1114 (2016).
  287. Lavie, C. J., Milani, R. V. & Ventura, H. O. Obesity and Cardiovascular Disease. Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 53 1925–1932 (2009).
  288. Tan, Y. L., Zheng, X. L. & Tang, C. K. The protective functions of omentin in cardiovascular diseases. *Clin. Chim. Acta* **448**, 98–106 (2015).
  289. Smekal, A. & Vaclavik, J. Adipokines and cardiovascular disease: A comprehensive review. *Biomed. Pap.* **161**, 31–40 (2017).
  290. Shibata, R., Ohashi, K., Murohara, T. & Ouchi, N. The potential of adipokines as therapeutic agents for cardiovascular disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews* vol. 25 483–487 (2014).
  291. Gu, N. *et al.* Anti-apoptotic and angiogenic effects of intelectin-1 in rat cerebral ischemia. *Brain Res. Bull.* **130**, 27–35 (2017).
  292. Maruyama, S. *et al.* Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **287**, 408–417 (2012).
  293. Aprahamian, T. R. & Sam, F. Adiponectin in Cardiovascular Inflammation and Obesity. *Int. J. Inflam.* **2011**, 1–8 (2011).
  294. Unno, K. *et al.* Adiponectin acts as a positive indicator of left ventricular diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* **96**, 357–361 (2010).
  295. Kistorp, C. *et al.* Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in

- patients with chronic heart failure. *Circulation* **112**, 1756–1762 (2005).
296. Wang, Y., Ma, X. L. & Lau, W. B. Cardiovascular Adiponectin Resistance: The Critical Role of Adiponectin Receptor Modification. *Trends in Endocrinology and Metabolism* vol. 28 519–530 (2017).
  297. Blanda, V., Bracale, U. M., Di Taranto, M. D. & Fortunato, G. Galectin-3 in cardiovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–18 (2020).
  298. Zhong, X., Qian, X., Chen, G. & Song, X. The role of galectin-3 in heart failure and cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **46**, 197–203 (2019).
  299. Agoston-Coldea, L. *et al.* The value of global longitudinal strain and galectin-3 for predicting cardiovascular events in patients with severe aortic stenosis. *Med. Ultrason.* **20**, 205–212 (2018).
  300. Mhaidat, N. M., Thorne, R., Zhang, X. D. & Hersey, P. Involvement of endoplasmic reticulum stress in Docetaxel-induced JNK-dependent apoptosis of human melanoma. *Apoptosis* **13**, 1505–1512 (2008).
  301. Mathur, A. *et al.* Subverting ER-stress towards apoptosis by nelfinavir and curcumin coexposure augments docetaxel efficacy in castration resistant prostate cancer cells. *PLoS One* **9**, (2014).
  302. Iida, S., Shimada, J. & Sakagami, H. Cytotoxicity induced by docetaxel in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *In Vivo (Brooklyn)*. **27**, 321–332 (2013).
  303. Wu, S., Li, Q., Du, M., Li, S. Y. & Ren, J. Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 81–87 (2007).
  304. Theccanat, T. *et al.* Regulation of cellular oxidative stress and apoptosis by G protein-coupled receptor kinase-2; The role of NADPH oxidase 4. *Cell. Signal.* **28**, 190–203 (2016).
  305. Kazama, K., Usui, T., Okada, M., Hara, Y. & Yamawaki, H. Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF- $\alpha$ -induced superoxide production in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **686**, 116–123 (2012).
  306. Kazama, K., Okada, M. & Yamawaki, H. A novel adipocytokine, omentin, inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration through antioxidative mechanism. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **306**, (2014).
  307. Tabaczar, S. *et al.* Quercetin attenuates oxidative stress in the blood plasma of rats bearing DMBA-induced mammary cancer and treated with a combination of doxorubicin and docetaxel. *Gen. Physiol. Biophys.* **32**, 535–543 (2013).
  308. Yang, Z., Fong, D. W. F., Yin, L., Wong, Y. & Huang, W. Liposomes modulate docetaxel-induced lipid oxidization and membrane damage in human hepatoma cells. *J. Liposome Res.* **19**, 122–130 (2009).
  309. Zhang, Z. *et al.* Taurine ameliorated homocysteine-induced H9C2

- cardiomyocyte apoptosis by modulating endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis* **22**, 647–661 (2017).
310. Wang, M. & Kaufman, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* vol. 529 326–335 (2016).
  311. Nishitoh, H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.* **151**, 217–219 (2012).
  312. Tsuru, A., Imai, Y., Saito, M. & Kohno, K. Novel mechanism of enhancing IRE1 $\alpha$ -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
  313. Azfer, A., Niu, J., Rogers, L. M., Adamski, F. M. & Kolattukudy, P. E. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **291**, (2006).
  314. Sahin, F. *et al.* The interaction between taxoids and serine/threonine protein phosphatase activities during taxan-induced apoptosis of HL 60 leukemic cells. *Hematology* **13**, 215–223 (2008).
  315. Avril, T., Vauléon, E. & Chevet, E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis* **6**, e373–e373 (2017).
  316. Younce, C. W. & Kolattukudy, P. E. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *Biochem. J.* **426**, 43–53 (2010).
  317. Qian, D. Z. *et al.* CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. *Prostate* **70**, 433–442 (2010).
  318. Fulbright, J. M., Egas-Bejar, D. E., Huh, W. W. & Chandra, J. Analysis of redox and apoptotic effects of anthracyclines to delineate a cardioprotective strategy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **76**, 1297–1307 (2015).
  319. Chong, W. C., Shastri, M. D. & Eri, R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 (2017).



## ANEXOS







## 8.1 SECUENCIACIÓN MICROARNs

Táboa 18. Resultados da secuenciación dos microARNs. Datos mostrados como media dos  $\log_2$  por grupo das contaxes por lectura.

<i>microARN</i>	Control	CDTXbasal	CDTXseguimento
<i>hsa-let-7a-3p</i>	0.904298817	0.844068594	0.797471356
<i>hsa-let-7a-5p</i>	7.91619239	7.31135913	7.678604364
<i>hsa-let-7b-3p</i>	0.743461461	0.358933759	0.641850097
<i>hsa-let-7b-5p</i>	9.317685411	9.077382248	9.250876596
<i>hsa-let-7c-5p</i>	3.590929552	3.084300813	3.402723738
<i>hsa-let-7d-3p</i>	5.513255533	4.887894535	5.122589899
<i>hsa-let-7d-5p</i>	6.113206189	5.382554809	5.977608573
<i>hsa-let-7e-3p</i>	0.09122558	0.043842637	0.028976072
<i>hsa-let-7e-5p</i>	3.963127703	3.139326461	3.382668259
<i>hsa-let-7f-1-3p</i>	0.242378171	0.247318053	0.145448575
<i>hsa-let-7f-2-3p</i>	0.253164879	0.394348344	0.189686317
<i>hsa-let-7f-5p</i>	8.644016796	8.673875768	8.484441744
<i>hsa-let-7g-3p</i>	0.019773599	0.013252984	0.018739671
<i>hsa-let-7g-5p</i>	8.937174755	8.837596532	9.113663124
<i>hsa-let-7i-3p</i>	0.136944781	0.194394743	0.164984904
<i>hsa-let-7i-5p</i>	10.64939413	10.78634756	10.86555389
<i>hsa-miR-100-5p</i>	3.45446036	3.28470563	3.400998576
<i>hsa-miR-103a-3p</i>	4.462776888	4.925203541	4.568993407
<i>hsa-miR-101-3p</i>	6.182130519	6.787586969	5.933351683
<i>hsa-miR-101-5p</i>	0.007096452	0.034506652	0.016104637
<i>hsa-miR-10393-5p</i>	0.057149357	0.00536761	0.09592676
<i>hsa-miR-10395-3p</i>	0.149603268	0.016079874	0.042726517
<i>hsa-miR-10399-3p</i>	1.633383545	1.501463245	1.695332799
<i>hsa-miR-10399-5p</i>	0.585318206	0.484306994	0.483154387
<i>hsa-miR-106a-5p</i>	0.530404587	0.825711345	0.554528651
<i>hsa-miR-10527-5p</i>	1.080475587	0.695387186	0.927160024
<i>hsa-miR-106a-3p</i>	0.052040405	0.053721915	0.010270326
<i>hsa-miR-107</i>	1.130213502	1.665951612	1.36296749
<i>hsa-miR-106b-3p</i>	4.654333459	4.65185383	4.931196083
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	1.492178843	1.93478314	1.569205506
<i>hsa-miR-10b-5p</i>	6.468822918	5.959805441	6.028829891

<i>hsa-miR-10a-3p</i>	0.219472462	0.202360969	0.288560418
<i>hsa-miR-10a-5p</i>	6.738805869	6.591963086	6.429245597
<i>hsa-miR-10b-3p</i>	0.409406711	0.208728155	0.370643834
<i>hsa-miR-122-5p</i>	8.790682394	8.321434065	9.089762945
<i>hsa-miR-11400</i>	1.759477515	1.585420199	1.608902603
<i>hsa-miR-11401</i>	0.548376329	0.606813594	0.573557985
<i>hsa-miR-1180-3p</i>	2.162144404	1.974121689	2.215219159
<i>hsa-miR-1183</i>	0.123988736	0.132581333	0.112160783
<i>hsa-miR-1185-1-3p</i>	0.651668983	0.682866598	0.587337878
<i>hsa-miR-1185-2-3p</i>	0.042546935	0.045697818	0.06451756
<i>hsa-miR-1197</i>	0.105215991	0.2534223	0.059165432
<i>hsa-miR-12136</i>	2.647707235	1.160677422	2.053151925
<i>hsa-miR-122-3p</i>	0.01250672	0.021549099	0.023081226
<i>hsa-miR-125a-5p</i>	4.282829076	3.828694562	4.082400246
<i>hsa-miR-1224-5p</i>	0.1420675	0.11007601	0.153409713
<i>hsa-miR-1226-3p</i>	0.055771987	0.028454001	0.021240422
<i>hsa-miR-1227-3p</i>	0.064669497	0.068108876	0.057896374
<i>hsa-miR-1228-5p</i>	0.125983397	0.163605356	0.116628431
<i>hsa-miR-1229-3p</i>	0.173135215	0.077831184	0.091074391
<i>hsa-miR-122b-5p</i>	0.026971612	0.029783693	0.04985299
<i>hsa-miR-1238-3p</i>	0.089550466	0.122039281	0.06050383
<i>hsa-miR-1246</i>	0.282871344	0.10292195	0.187370534
<i>hsa-miR-1248</i>	0.039632315	0.090094858	0.109524027
<i>hsa-miR-1249-3p</i>	0.066565686	0.088301447	0.06379799
<i>hsa-miR-1250-5p</i>	0.239061273	0.267884111	0.283513945
<i>hsa-miR-1255a</i>	0.450129357	0.589937422	0.39212928
<i>hsa-miR-125a-3p</i>	0.776240297	0.199485621	0.627626313
<i>hsa-miR-125b-5p</i>	1.032163657	0.97419503	1.051560808
<i>hsa-miR-125b-1-3p</i>	0.093115055	0.03805124	0.108636621
<i>hsa-miR-125b-2-3p</i>	0.139080922	0.143102941	0.202307566
<i>hsa-miR-126-3p</i>	8.143857635	8.59205339	8.421273149
<i>hsa-miR-130a-3p</i>	1.089873224	1.327181936	1.227088004
<i>hsa-miR-126-5p</i>	3.409817284	3.315282568	3.454828446
<i>hsa-miR-1260b</i>	0.007036433	0.022542268	0.034530152
<i>hsa-miR-1262</i>	0.007973983	0.015872604	0.009233953
<i>hsa-miR-127-3p</i>	2.453840839	3.03857617	2.882750428
<i>hsa-miR-127-5p</i>	0.148985714	0.454483939	0.210152414
<i>hsa-miR-1270</i>	0.178791076	0.106229494	0.120920801
<i>hsa-miR-1271-5p</i>	0.281209625	0.245823998	0.235827251
<i>hsa-miR-1273h-3p</i>	0.466951186	0.342166359	0.446399659
<i>hsa-miR-1273h-5p</i>	0.043347809	0.00747658	0.034405018
<i>hsa-miR-1277-3p</i>	0.091853916	0.292730082	0.146327194
<i>hsa-miR-1277-5p</i>	0.031450763	0.024481688	0.03452677
<i>hsa-miR-1278</i>	0.369111492	0.407758707	0.401485225
<i>hsa-miR-128-1-5p</i>	0.049684175	0.071756718	0.05241836
<i>hsa-miR-128-3p</i>	6.102910339	5.665782247	5.916237637

<i>hsa-miR-1284</i>	0.482058651	0.327405454	0.374940036
<i>hsa-miR-1287-5p</i>	0.710933333	0.537432243	0.616486011
<i>hsa-miR-1288-3p</i>	0.088268499	0.128140159	0.087783392
<i>hsa-miR-129-5p</i>	0.234141643	0.10149799	0.230157565
<i>hsa-miR-1291</i>	0.082456626	0.043855428	0.083594787
<i>hsa-miR-1292-5p</i>	0.574619431	0.445063238	0.599216803
<i>hsa-miR-1294</i>	0.659016422	0.499400542	0.73380594
<i>hsa-miR-1296-5p</i>	0.092583114	0.227698368	0.213553336
<i>hsa-miR-1299</i>	0.169903859	0.145321317	0.167273707
<i>hsa-miR-1301-3p</i>	3.650828213	3.354424592	3.600200714
<i>hsa-miR-1304-5p</i>	1.273664643	0.823759748	1.107110733
<i>hsa-miR-1306-3p</i>	0.209675571	0.214791904	0.235350115
<i>hsa-miR-1306-5p</i>	0.066483732	0.045385745	0.072749597
<i>hsa-miR-1307-3p</i>	5.549962233	5.311724785	5.608899245
<i>hsa-miR-1307-5p</i>	0.422226802	1.061256726	0.485623598
<i>hsa-miR-133a-3p</i>	0.404646215	0.503012445	0.493694158
<i>hsa-miR-130b-3p</i>	0.475173688	0.38284823	0.477491477
<i>hsa-miR-130b-5p</i>	1.920002103	1.508991382	1.606411578
<i>hsa-miR-132-3p</i>	0.373814388	0.394826507	0.381096655
<i>hsa-miR-132-5p</i>	0.059632289	0.19473971	0.099255128
<i>hsa-miR-1-3p</i>	2.438500072	1.760064905	2.050701464
<i>hsa-miR-134-5p</i>	4.227077001	3.452598103	3.802330875
<i>hsa-miR-1343-3p</i>	0.187054413	0.188774489	0.233979931
<i>hsa-miR-135a-3p</i>	0.110386905	0.079213876	0.142805321
<i>hsa-miR-135a-5p</i>	0.01454756	0.036846011	0.041042089
<i>hsa-miR-136-3p</i>	0.643366424	0.943380897	0.561541821
<i>hsa-miR-136-5p</i>	0.378129971	1.034222932	0.531426018
<i>hsa-miR-139-3p</i>	3.639538283	3.219118326	3.868945798
<i>hsa-miR-139-5p</i>	3.450857074	4.207842389	3.840856845
<i>hsa-miR-140-3p</i>	4.853468668	5.438172315	4.869591836
<i>hsa-miR-140-5p</i>	2.17579395	2.347980125	2.25761472
<i>hsa-miR-141-3p</i>	0.052338855	0.09029665	0.04911804
<i>hsa-miR-142-3p</i>	3.407997659	3.972402108	3.526819126
<i>hsa-miR-142-5p</i>	6.136975049	6.237563092	6.087115712
<i>hsa-miR-143-3p</i>	6.514400922	6.879286262	6.555091851
<i>hsa-miR-143-5p</i>	0.036279753	0.064358113	0.080463623
<i>hsa-miR-144-3p</i>	2.070166546	3.04252258	2.290075722
<i>hsa-miR-144-5p</i>	0.978344472	1.047903942	0.987095709
<i>hsa-miR-145-3p</i>	2.175975536	2.11062722	2.089146982
<i>hsa-miR-145-5p</i>	0.139292119	0.314288958	0.174785486
<i>hsa-miR-1468-5p</i>	0.871095461	0.634519824	0.77622125
<i>hsa-miR-146a-3p</i>	0.217340038	0.149719046	0.179641785
<i>hsa-miR-146a-5p</i>	8.20136775	7.765071234	7.936718072
<i>hsa-miR-146b-3p</i>	0.227894679	0.234092301	0.290578341
<i>hsa-miR-146b-5p</i>	6.485430415	6.894445792	6.790985634
<i>hsa-miR-147b-3p</i>	0.065597388	0.025081824	0.045750243

<i>hsa-miR-148a-3p</i>	10.36744236	10.95029038	10.37598997
<i>hsa-miR-148a-5p</i>	2.29198498	2.108840319	2.178977838
<i>hsa-miR-148b-3p</i>	6.296894697	6.340243508	6.027008765
<i>hsa-miR-148b-5p</i>	0.449392348	0.637744448	0.608123306
<i>hsa-miR-150-3p</i>	1.094306906	0.769032311	0.981228144
<i>hsa-miR-150-5p</i>	2.305119368	2.208474034	2.432668986
<i>hsa-miR-151a-3p</i>	9.122088128	9.56234141	9.159893433
<i>hsa-miR-151a-5p</i>	0.454057619	0.38834429	0.539557963
<i>hsa-miR-151b</i>	0.055342237	0.057425819	0.09467
<i>hsa-miR-152-3p</i>	4.004391465	4.107317558	4.21059956
<i>hsa-miR-152-5p</i>	0.101607855	0.09795457	0.091722343
<i>hsa-miR-1538</i>	0.241251289	0.179326412	0.251272039
<i>hsa-miR-154-5p</i>	0.055400109	0.025509791	0.051898806
<i>hsa-miR-155-5p</i>	2.656589912	2.349163732	2.585794652
<i>hsa-miR-15a-5p</i>	0.387192123	0.724754643	0.495510232
<i>hsa-miR-15b-3p</i>	0.809832463	1.129970767	0.841490606
<i>hsa-miR-15b-5p</i>	0.602586646	0.813752614	0.684920438
<i>hsa-miR-16-1-3p</i>	0.013381215	0.047984847	0.018103849
<i>hsa-miR-16-2-3p</i>	5.543313363	5.496048785	5.359444315
<i>hsa-miR-16-5p</i>	3.81719703	4.184791982	4.021808683
<i>hsa-miR-17-3p</i>	0.072586004	0.068379344	0.072818488
<i>hsa-miR-17-5p</i>	3.26543556	3.783708216	3.521780117
<i>hsa-miR-181a-2-3p</i>	1.454459165	1.195953004	1.183688183
<i>hsa-miR-181a-3p</i>	0.367637378	0.528370363	0.459350235
<i>hsa-miR-181a-5p</i>	4.100280998	4.271928235	4.278788665
<i>hsa-miR-181b-3p</i>	0.00674406	0.014745189	0.03291485
<i>hsa-miR-181b-5p</i>	1.301518058	1.182559021	1.42527893
<i>hsa-miR-181c-3p</i>	0.181212494	0.361999396	0.216558123
<i>hsa-miR-181c-5p</i>	0.036644961	0.110887181	0.056781061
<i>hsa-miR-181d-5p</i>	1.096626271	1.267995426	1.29308524
<i>hsa-miR-182-5p</i>	3.27187019	3.663853876	3.446426906
<i>hsa-miR-183-5p</i>	3.082690554	3.66882362	3.570856517
<i>hsa-miR-184</i>	0.03195025	0.10562094	0.068614307
<i>hsa-miR-1843</i>	3.429992056	3.214619589	3.359575496
<i>hsa-miR-185-3p</i>	1.132630699	1.521418313	1.438989835
<i>hsa-miR-185-5p</i>	6.468615848	6.212476945	6.157290519
<i>hsa-miR-186-5p</i>	5.63644707	6.348725032	5.967185755
<i>hsa-miR-187-3p</i>	0.011424645	0.091300652	0.021050305
<i>hsa-miR-188-5p</i>	0.043566737	0.00402664	0.033821961
<i>hsa-miR-18a-3p</i>	0.226775101	0.338482404	0.335159632
<i>hsa-miR-18a-5p</i>	0.439917799	0.78095901	0.633351285
<i>hsa-miR-18b-3p</i>	0.067857076	0.070335105	0.061033331
<i>hsa-miR-18b-5p</i>	0.024131293	0.048398275	0.041824615
<i>hsa-miR-1908-3p</i>	0.073259004	0.026333389	0.049467129
<i>hsa-miR-1908-5p</i>	2.687619308	1.736409222	2.625456172
<i>hsa-miR-1909-5p</i>	0.055794225	0.028784789	0.034142249

<i>hsa-miR-190a-5p</i>	0.034012582	0.052852488	0.042772966
<i>hsa-miR-190b-5p</i>	0.210253461	0.185557996	0.222119295
<i>hsa-miR-191-3p</i>	1.167886032	0.982177898	1.205872213
<i>hsa-miR-191-5p</i>	7.164429827	7.341654192	7.44065539
<i>hsa-miR-1914-5p</i>	0.117850969	0.101804872	0.09477333
<i>hsa-miR-192-5p</i>	5.376222454	5.831837385	5.720950641
<i>hsa-miR-193a-5p</i>	1.590794336	0.877424945	1.597260877
<i>hsa-miR-193b-3p</i>	0.007096452	0.017043358	0.043922084
<i>hsa-miR-193b-5p</i>	0.469610539	0.261649809	0.575818569
<i>hsa-miR-194-3p</i>	0.011784342	0.011974665	0.045034011
<i>hsa-miR-194-5p</i>	2.025842099	2.079270298	2.222636942
<i>hsa-miR-195-3p</i>	0.33271443	0.368033082	0.419378064
<i>hsa-miR-195-5p</i>	0.143362742	0.172751339	0.190172513
<i>hsa-miR-196a-5p</i>	0.041008406	0.009036611	0.048124966
<i>hsa-miR-196b-5p</i>	0.99325485	1.009691997	0.951640794
<i>hsa-miR-197-3p</i>	1.361483127	1.043759205	1.355287098
<i>hsa-miR-197-5p</i>	0.090043997	0.040356685	0.094602479
<i>hsa-miR-1976</i>	0.261321462	0.125243859	0.25936122
<i>hsa-miR-199a-3p</i>	3.810278419	4.075364772	4.229670933
<i>hsa-miR-199a-5p</i>	4.964480446	5.55018381	5.129952835
<i>hsa-miR-199b-3p</i>	3.810278419	4.075364772	4.229670933
<i>hsa-miR-199b-5p</i>	0.605199703	1.044698037	0.694224347
<i>hsa-miR-19a-3p</i>	1.147317165	1.644047163	1.307898181
<i>hsa-miR-19b-3p</i>	2.175290493	2.686431554	2.186388602
<i>hsa-miR-200a-3p</i>	0.618683158	0.695975124	0.808163736
<i>hsa-miR-200a-5p</i>	0.01708294	0.106600774	0.039184902
<i>hsa-miR-200b-3p</i>	0.413371684	0.475977564	0.565391871
<i>hsa-miR-200b-5p</i>	0.055976214	0.065455692	0.112799341
<i>hsa-miR-200c-3p</i>	1.085623554	1.064668544	1.086922193
<i>hsa-miR-203a-3p</i>	0.131829635	0.053403355	0.060013604
<i>hsa-miR-204-3p</i>	0.129024114	0.120676951	0.12972402
<i>hsa-miR-204-5p</i>	0.212293897	0.340346685	0.344417073
<i>hsa-miR-205-5p</i>	0.04155493	0.012402059	0.026470482
<i>hsa-miR-206</i>	0.367095347	0.375380831	0.474288586
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	4.25965791	4.883197042	4.299323922
<i>hsa-miR-20b-3p</i>	0.026986062	0.052645688	0.009594687
<i>hsa-miR-20b-5p</i>	1.261108685	1.534910712	1.451530943
<i>hsa-miR-21-3p</i>	0.705620332	1.029082217	0.577346519
<i>hsa-miR-210-3p</i>	0.715885256	1.055027836	0.904438098
<i>hsa-miR-214-3p</i>	0.074556134	0.014029747	0.055368984
<i>hsa-miR-2110</i>	3.518409778	2.898760769	3.341095418
<i>hsa-miR-2115-3p</i>	0.054406028	0.063498464	0.024850989
<i>hsa-miR-2115-5p</i>	0.025930187	0.021198046	0.031363992
<i>hsa-miR-212-5p</i>	0.126818834	0.13038336	0.155502743
<i>hsa-miR-21-5p</i>	10.25984914	10.44310249	10.17127745
<i>hsa-miR-214-5p</i>	0.057881942	0.063725206	0.116979284

<i>hsa-miR-215-5p</i>	1.729852311	1.66405783	1.604604299
<i>hsa-miR-216b-5p</i>	0.003335806	0.029057155	0.044503964
<i>hsa-miR-218-5p</i>	0.112710925	0.057511065	0.059122779
<i>hsa-miR-219a-1-3p</i>	0.072466807	0.094027585	0.118591373
<i>hsa-miR-219b-5p</i>	0.00945859	0.029504057	0.016953348
<i>hsa-miR-221-3p</i>	6.515996258	6.324612691	6.770792919
<i>hsa-miR-22-5p</i>	2.369546501	1.957768749	2.268717713
<i>hsa-miR-222-3p</i>	6.817122802	6.442909651	6.600132287
<i>hsa-miR-221-5p</i>	2.003322096	1.726151297	1.584761931
<i>hsa-miR-223-3p</i>	2.839211694	3.358782353	3.10359601
<i>hsa-miR-22-3p</i>	7.136370952	6.766846106	6.986858946
<i>hsa-miR-223-5p</i>	5.285105628	5.353861927	5.28777975
<i>hsa-miR-224-5p</i>	4.669846908	3.649620112	4.303986208
<i>hsa-miR-2277-5p</i>	0.022173993	0.047518489	0.024982574
<i>hsa-miR-2355-3p</i>	0.657165597	0.553654028	0.73284161
<i>hsa-miR-2355-5p</i>	0.038354175	0.057391577	0.022293535
<i>hsa-miR-23a-3p</i>	2.869828327	3.770821536	3.132568725
<i>hsa-miR-23a-5p</i>	1.46186285	0.903709662	1.320008766
<i>hsa-miR-23b-3p</i>	0.385894782	0.722693762	0.535672038
<i>hsa-miR-23b-5p</i>	1.140785263	0.39536292	0.87332457
<i>hsa-miR-24-1-5p</i>	0.114677917	0.181196028	0.160617059
<i>hsa-miR-24-2-5p</i>	1.381061992	1.878295236	1.458240288
<i>hsa-miR-24-3p</i>	6.235439632	5.973047716	6.178187311
<i>hsa-miR-25-3p</i>	8.407069933	8.438802806	8.494429279
<i>hsa-miR-25-5p</i>	0.960208432	0.657196472	0.91918265
<i>hsa-miR-26a-1-3p</i>	0.126731995	0.108018454	0.113808815
<i>hsa-miR-26a-2-3p</i>	0.243040964	0.233141169	0.151660738
<i>hsa-miR-26a-5p</i>	8.694403224	9.067585403	8.779111396
<i>hsa-miR-26b-3p</i>	0.462737962	0.347874877	0.469167908
<i>hsa-miR-26b-5p</i>	5.599177772	6.103972377	5.917326268
<i>hsa-miR-27a-3p</i>	6.025455151	6.207453556	6.15746456
<i>hsa-miR-27a-5p</i>	0.411300692	0.447768296	0.429981854
<i>hsa-miR-27b-3p</i>	5.098950434	5.423007844	5.34066072
<i>hsa-miR-27b-5p</i>	0.436085815	0.49027581	0.530858316
<i>hsa-miR-28-3p</i>	5.196740866	4.789665933	5.12436321
<i>hsa-miR-28-5p</i>	1.593316541	1.580189335	1.698161658
<i>hsa-miR-296-3p</i>	0.190149835	0.11873902	0.110196591
<i>hsa-miR-296-5p</i>	0.103858833	0.067738385	0.109420752
<i>hsa-miR-299-3p</i>	0.046241252	0.076263423	0.036766604
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	3.305437143	3.63842951	3.441083109
<i>hsa-miR-29b-2-5p</i>	0.057777422	0.051481595	0.071696307
<i>hsa-miR-29b-3p</i>	0.25909572	0.481946983	0.287125745
<i>hsa-miR-29c-3p</i>	0.295228558	0.427993568	0.430025637
<i>hsa-miR-29c-5p</i>	0.166545228	0.342069893	0.288059355
<i>hsa-miR-301a-3p</i>	0.057333446	0.075510402	0.037912675
<i>hsa-miR-301a-5p</i>	0.212630001	0.335280444	0.295296307



<i>hsa-miR-301b-3p</i>	0.053666404	0.104916087	0.109478643
<i>hsa-miR-3064-5p</i>	0.261954785	0.304550363	0.332734846
<i>hsa-miR-3065-5p</i>	0.005070379	0.046190253	0.044102386
<i>hsa-miR-3074-5p</i>	0.137292466	0.202246828	0.199948806
<i>hsa-miR-30a-3p</i>	1.682588408	1.636870108	1.880411039
<i>hsa-miR-30a-5p</i>	4.184617767	4.253099091	4.308317625
<i>hsa-miR-30b-3p</i>	0.582746141	0.521051294	0.572022932
<i>hsa-miR-30b-5p</i>	0.776431626	1.371139227	1.110365854
<i>hsa-miR-30c-1-3p</i>	0.27179913	0.30524547	0.33027263
<i>hsa-miR-30c-2-3p</i>	0.187583136	0.150344514	0.158517285
<i>hsa-miR-30c-5p</i>	3.995922342	4.093484407	3.86428707
<i>hsa-miR-30d-3p</i>	0.601578911	1.015952301	0.687349291
<i>hsa-miR-30d-5p</i>	10.04673446	10.01869075	9.933043679
<i>hsa-miR-30e-3p</i>	3.533614949	3.814991838	3.648634888
<i>hsa-miR-30e-5p</i>	5.815643384	6.122241339	5.860318595
<i>hsa-miR-3115</i>	0.034631715	0.019257533	0.021403973
<i>hsa-miR-3120-3p</i>	0.776126599	0.531073096	0.647015207
<i>hsa-miR-3120-5p</i>	0.463570103	0.364121376	0.306574572
<i>hsa-miR-3121-3p</i>	0.076649638	0.03693263	0.031414657
<i>hsa-miR-3124-5p</i>	0.093515567	0.059845112	0.111475886
<i>hsa-miR-3127-3p</i>	0.091188646	0.056809814	0.085092529
<i>hsa-miR-3127-5p</i>	0.175879336	0.070768988	0.136395403
<i>hsa-miR-3128</i>	0.029709713	0.060876485	0.019606769
<i>hsa-miR-3131</i>	0.075749766	0.013047004	0.028279344
<i>hsa-miR-3135a</i>	0.058812485	0.054516698	0.077029675
<i>hsa-miR-3138</i>	0.926718047	0.712240647	0.923743859
<i>hsa-miR-3140-3p</i>	0.111836427	0.056703038	0.104938947
<i>hsa-miR-3143</i>	0.201069622	0.206141263	0.142134554
<i>hsa-miR-3146</i>	0.091364555	0.027274708	0.057862239
<i>hsa-miR-3150a-5p</i>	0.098407605	0.117533425	0.061493476
<i>hsa-miR-3150b-3p</i>	0.114203681	0.063372759	0.06213116
<i>hsa-miR-3154</i>	0.048512949	0.022050758	0.013448769
<i>hsa-miR-3157-3p</i>	0.071424155	0.076250096	0.076733927
<i>hsa-miR-3158-3p</i>	0.723968676	1.488942404	0.832181519
<i>hsa-miR-3163</i>	0.036206048	0.055225119	0.015604168
<i>hsa-miR-3164</i>	0.10805385	0.095436106	0.062555259
<i>hsa-miR-3173-3p</i>	0.015091117	0.010552616	0.015264393
<i>hsa-miR-3173-5p</i>	0.481204774	0.237130755	0.371996942
<i>hsa-miR-3174</i>	0.082228311	0.039107485	0.104090724
<i>hsa-miR-3175</i>	0.08032447	0.055311382	0.070564416
<i>hsa-miR-3177-3p</i>	0.991913537	0.776638355	0.908513556
<i>hsa-miR-3180</i>	0.098090265	0.02038645	0.020969403
<i>hsa-miR-3180-3p</i>	0.09401648	0.02038645	0.020969403
<i>hsa-miR-3187-3p</i>	0.102873244	0.044493325	0.060769606
<i>hsa-miR-3187-5p</i>	0.017196723	0.014766516	0.021088475
<i>hsa-miR-3188</i>	0.0353385	0.028389996	0.05670905



<i>hsa-miR-3190-3p</i>	0.069171295	0.056319998	0.100265703
<i>hsa-miR-3191-3p</i>	0.210539068	0.275564014	0.227160383
<i>hsa-miR-3192-5p</i>	0.032044936	0.01874651	0.021604314
<i>hsa-miR-3198</i>	0.14066062	0.048655556	0.086390638
<i>hsa-miR-3199</i>	0	0.010047589	0.023712505
<i>hsa-miR-32-3p</i>	0.231417466	0.284276121	0.248793664
<i>hsa-miR-32-5p</i>	1.9456375	2.429825084	1.819480895
<i>hsa-miR-3200-5p</i>	0.026081049	0.048377034	0.03491969
<i>hsa-miR-320a-3p</i>	9.798486647	8.865738747	9.242214134
<i>hsa-miR-320b</i>	4.132807964	3.384621553	3.720987643
<i>hsa-miR-320c</i>	1.553885665	0.928820872	1.220111726
<i>hsa-miR-320d</i>	0.729547051	0.399276833	0.566846121
<i>hsa-miR-320e</i>	0.632441521	0.3250736	0.328182318
<i>hsa-miR-323a-3p</i>	1.694266261	1.400571266	1.422657863
<i>hsa-miR-323a-5p</i>	0.207412795	0.121410173	0.234715684
<i>hsa-miR-323b-3p</i>	2.227050521	1.952732747	1.82454437
<i>hsa-miR-324-3p</i>	0.391174252	0.589686774	0.426501187
<i>hsa-miR-324-5p</i>	0.051265655	0.113891355	0.063846646
<i>hsa-miR-326</i>	1.33453558	1.870877983	1.631477936
<i>hsa-miR-328-3p</i>	5.136192649	4.69729598	4.742287986
<i>hsa-miR-328-5p</i>	0.011193163	0.02768827	0.013131248
<i>hsa-miR-329-3p</i>	0.309492409	0.350233068	0.347385931
<i>hsa-miR-329-5p</i>	0.061365493	0.039675196	0.040743835
<i>hsa-miR-330-3p</i>	3.166058072	3.162235099	3.242521355
<i>hsa-miR-330-5p</i>	0.246705417	0.499048394	0.365877452
<i>hsa-miR-331-3p</i>	0.036376253	0.118600207	0.07934949
<i>hsa-miR-331-5p</i>	0.374251913	0.379885979	0.247757676
<i>hsa-miR-335-3p</i>	2.432483736	3.028394623	2.75949572
<i>hsa-miR-335-5p</i>	1.988811435	1.926936803	1.779986654
<i>hsa-miR-337-3p</i>	0.559142622	0.611796152	0.485915718
<i>hsa-miR-337-5p</i>	0.085014395	0.052209225	0.032740455
<i>hsa-miR-338-3p</i>	0.057676556	0.090800411	0.054074551
<i>hsa-miR-338-5p</i>	1.893417387	1.585072963	1.80704774
<i>hsa-miR-339-3p</i>	1.914103132	1.863053503	1.834390097
<i>hsa-miR-339-5p</i>	1.318817455	1.372261285	1.133212475
<i>hsa-miR-33a-5p</i>	0.067019749	0.082784904	0.04405932
<i>hsa-miR-340-3p</i>	1.477117749	1.69104987	1.307386231
<i>hsa-miR-340-5p</i>	5.429818443	5.559150961	4.933359986
<i>hsa-miR-342-3p</i>	0.972514661	1.380507906	1.299598678
<i>hsa-miR-342-5p</i>	2.572597092	2.631327967	2.763251469
<i>hsa-miR-345-5p</i>	0.607666992	0.833653853	0.807099263
<i>hsa-miR-34a-5p</i>	0.013044639	0.0147034	0.041530179
<i>hsa-miR-34c-5p</i>	0.047285119	0.198130155	0.046886904
<i>hsa-miR-3605-3p</i>	0.496405831	0.570372188	0.4862519
<i>hsa-miR-3605-5p</i>	0.475970257	0.421547426	0.508043075
<i>hsa-miR-361-3p</i>	4.524506623	5.247485455	4.874568973

<i>hsa-miR-361-5p</i>	1.0668748	1.123517305	1.240057608
<i>hsa-miR-3613-3p</i>	0.023843222	0.031344147	0.066562045
<i>hsa-miR-3613-5p</i>	1.241927634	1.247894394	1.145086889
<i>hsa-miR-3614-5p</i>	0.07353888	0.134937338	0.12915223
<i>hsa-miR-3615</i>	3.767559534	4.127214092	3.852598798
<i>hsa-miR-3617-5p</i>	0.162593537	0.103784343	0.090964765
<i>hsa-miR-362-5p</i>	0.095692136	0.045891196	0.065115645
<i>hsa-miR-363-3p</i>	4.306651484	4.657111722	4.496216333
<i>hsa-miR-363-5p</i>	0.394434853	0.394304135	0.364213622
<i>hsa-miR-365b-5p</i>	0.022158151	0.017967915	0.008211661
<i>hsa-miR-3678-5p</i>	0.041808101	0.06682344	0.017799361
<i>hsa-miR-3679-5p</i>	0.31992999	0.367559484	0.341814349
<i>hsa-miR-3682-3p</i>	0.099038856	0.024800057	0.070772448
<i>hsa-miR-3688-3p</i>	0.079381979	0.063899446	0.032615959
<i>hsa-miR-369-3p</i>	1.088843738	0.911551999	0.976419319
<i>hsa-miR-369-5p</i>	0.348594598	0.420024764	0.497719559
<i>hsa-miR-3691-5p</i>	0.201281514	0.103226192	0.143453547
<i>hsa-miR-370-3p</i>	2.623565223	3.548422451	2.727943841
<i>hsa-miR-370-5p</i>	0.028845657	0.064175896	0.029736467
<i>hsa-miR-371b-5p</i>	0.016098438	0.035837306	0.012500031
<i>hsa-miR-374a-3p</i>	0.838899183	1.131051293	0.725665922
<i>hsa-miR-374a-5p</i>	1.770225297	2.288027012	1.839839953
<i>hsa-miR-374b-3p</i>	0.120052497	0.180849279	0.121096791
<i>hsa-miR-374b-5p</i>	1.384295352	1.754121417	1.405825858
<i>hsa-miR-374c-5p</i>	0.027341539	0.081325088	0.0439079
<i>hsa-miR-375-3p</i>	2.560763621	2.138569553	2.803552483
<i>hsa-miR-376a-3p</i>	0.084364163	0.080418848	0.05334097
<i>hsa-miR-376b-3p</i>	0.015522306	0.033300405	0.011763508
<i>hsa-miR-376c-3p</i>	0.255559535	0.3702307	0.193642784
<i>hsa-miR-377-3p</i>	0.224473179	0.318176958	0.206690258
<i>hsa-miR-377-5p</i>	0.070254661	0.060009487	0.053475124
<i>hsa-miR-378a-3p</i>	3.579193956	3.167497632	3.49454688
<i>hsa-miR-378a-5p</i>	0.058779028	0.142368777	0.086631126
<i>hsa-miR-378c</i>	0.621326763	0.475938913	0.521744426
<i>hsa-miR-378d</i>	0.022994684	0.044532308	0.007263066
<i>hsa-miR-378i</i>	0.067643813	0.043274456	0.048392314
<i>hsa-miR-379-3p</i>	0.253088226	0.340535737	0.252238797
<i>hsa-miR-379-5p</i>	2.594245936	2.852537029	2.719057255
<i>hsa-miR-380-5p</i>	0.02698588	0.098097081	0.096007122
<i>hsa-miR-381-3p</i>	4.052032256	5.294744126	4.056149292
<i>hsa-miR-382-3p</i>	0.70894628	0.845781498	0.674435606
<i>hsa-miR-382-5p</i>	3.532671069	2.760961629	3.319153398
<i>hsa-miR-3909</i>	0.130946573	0.104801302	0.190414963
<i>hsa-miR-3911</i>	0.029045252	0.013511791	0.016476013
<i>hsa-miR-3912-3p</i>	0.096965556	0.121740197	0.098057304
<i>hsa-miR-3913-5p</i>	0.248503711	0.242701599	0.225432433

<i>hsa-miR-3920</i>	0.119408851	0.120096807	0.08330783
<i>hsa-miR-3922-3p</i>	0.136090498	0.075015114	0.157094013
<i>hsa-miR-3928-3p</i>	0.610274112	0.398057481	0.471794673
<i>hsa-miR-3934-5p</i>	0.042832511	0.034302928	0.031003702
<i>hsa-miR-3936</i>	0.030031737	0.014221015	0.017992446
<i>hsa-miR-3939</i>	0.038002017	0.039853655	0.030824329
<i>hsa-miR-3940-3p</i>	0.010675329	0.058759332	0.058015056
<i>hsa-miR-3942-5p</i>	0.032032049	0.055616008	0.022845254
<i>hsa-miR-409-3p</i>	5.994551225	5.974484472	5.820911005
<i>hsa-miR-409-5p</i>	0.265526868	0.59684678	0.364907935
<i>hsa-miR-410-3p</i>	0.508258093	0.739164352	0.472736031
<i>hsa-miR-411-3p</i>	0.963431948	0.899432185	0.770908234
<i>hsa-miR-411-5p</i>	0.752033539	1.089592587	0.823899113
<i>hsa-miR-412-5p</i>	0.148027764	0.132164199	0.112457902
<i>hsa-miR-421</i>	1.181727991	1.347685059	1.409719747
<i>hsa-miR-423-3p</i>	7.020744557	6.798834134	6.948863444
<i>hsa-miR-423-5p</i>	11.2057637	10.69526824	10.98881791
<i>hsa-miR-424-3p</i>	1.742697293	1.280272313	1.630328749
<i>hsa-miR-424-5p</i>	0.185086622	0.323843136	0.186679663
<i>hsa-miR-425-3p</i>	1.875814203	2.311357083	2.08911344
<i>hsa-miR-425-5p</i>	3.916109711	4.412580182	4.004400233
<i>hsa-miR-429</i>	0.099373379	0.094451774	0.127141275
<i>hsa-miR-431-3p</i>	0.115645825	0.207371547	0.133702956
<i>hsa-miR-431-5p</i>	0.426945731	0.718675027	0.48051198
<i>hsa-miR-432-5p</i>	3.701431054	2.736798881	2.967262463
<i>hsa-miR-4326</i>	0.68802433	0.732787675	0.613343984
<i>hsa-miR-433-3p</i>	2.249483465	1.701573527	1.977776902
<i>hsa-miR-4433b-3p</i>	3.471370742	3.959115661	3.383496796
<i>hsa-miR-4433b-5p</i>	3.213401118	2.753801281	3.099409787
<i>hsa-miR-4435</i>	0.195385435	0.211181786	0.237080346
<i>hsa-miR-4446-3p</i>	3.59311937	2.484346369	3.169939828
<i>hsa-miR-4449</i>	0.033023296	0.008523448	0.035863366
<i>hsa-miR-4466</i>	0.037211951	0.043281456	0.03286248
<i>hsa-miR-4470</i>	0.035222296	0.045659681	0.036486765
<i>hsa-miR-4473</i>	0.196532472	0.307928161	0.203302201
<i>hsa-miR-4474-3p</i>	0.023778712	0.022041551	0.027916344
<i>hsa-miR-4485-3p</i>	0.183568424	0.005015908	0.04148397
<i>hsa-miR-4485-5p</i>	0.354937493	0.005015908	0.088783186
<i>hsa-miR-4489</i>	0.081421538	0.045296343	0.044395452
<i>hsa-miR-4498</i>	0.103757346	0.056665298	0.068204674
<i>hsa-miR-4504</i>	0.071332789	0.098209169	0.091101696
<i>hsa-miR-450a-2-3p</i>	0.057469094	0.043685416	0.062768476
<i>hsa-miR-450a-5p</i>	0.520542073	0.560906369	0.535925122
<i>hsa-miR-450b-5p</i>	0.936489701	0.954151618	0.676835677
<i>hsa-miR-4511</i>	0.082580865	0.214631904	0.126208288
<i>hsa-miR-451a</i>	10.86936319	11.65580058	10.80376179

<i>hsa-miR-452-3p</i>	0.094371927	0.039425058	0.088158794
<i>hsa-miR-452-5p</i>	1.060014057	0.697113978	0.832385677
<i>hsa-miR-4521</i>	0.014363866	0.017999332	0.013239891
<i>hsa-miR-4525</i>	0.115155144	0.11494848	0.080743084
<i>hsa-miR-4533</i>	0.227145184	0.100209032	0.200738196
<i>hsa-miR-454-3p</i>	0.541279181	0.454223657	0.615834253
<i>hsa-miR-454-5p</i>	0.63933758	0.662488399	0.562406914
<i>hsa-miR-455-5p</i>	0.048763612	0.096327272	0.166316924
<i>hsa-miR-4637</i>	0.015228817	0.044915165	0.038002647
<i>hsa-miR-4638-5p</i>	0.124843076	0.066105205	0.179588596
<i>hsa-miR-4639-5p</i>	0.021794728	0.013933193	0.007986431
<i>hsa-miR-4645-3p</i>	0.19546829	0.209156605	0.200882391
<i>hsa-miR-4646-3p</i>	0.0685518	0.023627929	0.043665899
<i>hsa-miR-4646-5p</i>	0.316465662	0.166106965	0.219404796
<i>hsa-miR-4647</i>	0.12763953	0.106853491	0.081490704
<i>hsa-miR-4654</i>	0.115501877	0.130812214	0.129554467
<i>hsa-miR-4657</i>	0.099856822	0.073334722	0.07231028
<i>hsa-miR-4659a-3p</i>	0.147878751	0.198274448	0.117591191
<i>hsa-miR-4659b-3p</i>	0.514371618	0.488021378	0.473508598
<i>hsa-miR-4659b-5p</i>	0.080784054	0.049763679	0.039427014
<i>hsa-miR-4660</i>	0.035248471	0.01857538	0.009244379
<i>hsa-miR-4661-5p</i>	0.13352395	0.098959664	0.091597091
<i>hsa-miR-4662a-5p</i>	0.242902596	0.118906399	0.192781474
<i>hsa-miR-4664-3p</i>	0.17274591	0.352402694	0.175144902
<i>hsa-miR-4665-5p</i>	0.661992639	0.491912199	0.892910328
<i>hsa-miR-4667-5p</i>	0.050048025	0.054791769	0.058124629
<i>hsa-miR-4668-5p</i>	0.023799162	0.047396133	0.056550837
<i>hsa-miR-4669</i>	0.051185115	0.092530891	0.035375388
<i>hsa-miR-4676-3p</i>	0.094681368	0.050040248	0.035215809
<i>hsa-miR-4677-3p</i>	0.149146836	0.206486088	0.163682741
<i>hsa-miR-4677-5p</i>	0.045494421	0.015923235	0.013692967
<i>hsa-miR-4685-3p</i>	0.09840161	0.120447377	0.124868365
<i>hsa-miR-4688</i>	0.015358992	0.022163843	0.018760337
<i>hsa-miR-4690-3p</i>	0.003700627	0.03143592	0.014538358
<i>hsa-miR-4709-5p</i>	0.033399327	0.00858148	0.029887251
<i>hsa-miR-4726-5p</i>	0.00691737	0.021782807	0.016354101
<i>hsa-miR-4732-3p</i>	0.490619654	0.485943646	0.623276976
<i>hsa-miR-4732-5p</i>	1.623781661	1.095781699	1.205815263
<i>hsa-miR-4734</i>	0.055092753	0.059668415	0.042791721
<i>hsa-miR-4738-3p</i>	0.400522461	0.125602195	0.199499707
<i>hsa-miR-4741</i>	0.001734572	0.026895465	0.034459511
<i>hsa-miR-4742-3p</i>	0.13180894	0.227221544	0.121562251
<i>hsa-miR-4742-5p</i>	0.050501898	0.029055246	0.06134491
<i>hsa-miR-4743-5p</i>	0.059497185	0.016327122	0.036972329
<i>hsa-miR-4746-5p</i>	0.336201681	0.464109172	0.470561503
<i>hsa-miR-4748</i>	0.036692065	0.042787414	0.033901063

<i>hsa-miR-4750-5p</i>	0.214079679	0.100068129	0.135570065
<i>hsa-miR-4753-5p</i>	0.023574014	0.009119392	0.016942577
<i>hsa-miR-4754</i>	0.048514328	0.008662137	0.063229788
<i>hsa-miR-4755-3p</i>	0.024220827	0.002964094	0.060296596
<i>hsa-miR-4755-5p</i>	0.039781942	0.05906422	0.068013301
<i>hsa-miR-4762-3p</i>	0.034387668	0.065191356	0.059983355
<i>hsa-miR-4765</i>	0.008478632	0.043832342	0.015514144
<i>hsa-miR-4772-3p</i>	0.003700627	0.055310901	0.012224591
<i>hsa-miR-4772-5p</i>	0.021767307	0.054900986	0.021183602
<i>hsa-miR-4775</i>	0.069127641	0.014732797	0.048555194
<i>hsa-miR-4777-3p</i>	0.014049092	0.05103969	0.031569649
<i>hsa-miR-4781-3p</i>	0.00603984	0.01948197	0.032430452
<i>hsa-miR-4786-5p</i>	0.036812362	0.044783357	0.046857334
<i>hsa-miR-4796-5p</i>	0.026990129	0.016192317	0.015363932
<i>hsa-miR-4797-3p</i>	0.030498898	0.016781	0.019832144
<i>hsa-miR-483-3p</i>	0.035178217	0.013209267	0.121932119
<i>hsa-miR-483-5p</i>	1.127507972	0.580371537	1.334288837
<i>hsa-miR-484</i>	3.888657431	3.736081551	3.841787835
<i>hsa-miR-485-3p</i>	0.595412174	0.404494337	0.537886447
<i>hsa-miR-485-5p</i>	2.53996561	2.124948604	2.39217804
<i>hsa-miR-486-3p</i>	2.941689617	2.186558145	2.74815598
<i>hsa-miR-486-5p</i>	9.62870139	9.164348896	9.346268005
<i>hsa-miR-487a-3p</i>	0.048545103	0.042130592	0.089344861
<i>hsa-miR-487a-5p</i>	0.258171482	0.247747728	0.382319927
<i>hsa-miR-487b-3p</i>	0.291990159	0.48154774	0.459461077
<i>hsa-miR-487b-5p</i>	0.027391403	0.028727825	0.030989365
<i>hsa-miR-490-3p</i>	0.226168271	0.070210317	0.096043205
<i>hsa-miR-491-5p</i>	0.013678001	0.030321653	0.050886851
<i>hsa-miR-493-3p</i>	1.695170104	2.595759044	1.860003239
<i>hsa-miR-493-5p</i>	1.958515706	2.597610477	2.146454668
<i>hsa-miR-494-3p</i>	0.383533904	1.201053269	0.718997879
<i>hsa-miR-495-3p</i>	1.488002524	1.769787183	1.409892742
<i>hsa-miR-496</i>	0.029050538	0.013506762	0.012935351
<i>hsa-miR-497-5p</i>	0.015939731	0.091316965	0.030316518
<i>hsa-miR-4999-5p</i>	0.054889124	0.034212414	0.042884705
<i>hsa-miR-499a-5p</i>	0.711853592	0.627785049	0.599964011
<i>hsa-miR-5001-3p</i>	0.040058979	0.060649849	0.042900079
<i>hsa-miR-5004-5p</i>	0.03664285	0.078042372	0.027668999
<i>hsa-miR-5006-3p</i>	0.029049667	0.013741963	0.03398176
<i>hsa-miR-5009-5p</i>	0.126719748	0.11417173	0.16143538
<i>hsa-miR-500a-3p</i>	0.723361101	0.72474267	0.610955228
<i>hsa-miR-500b-3p</i>	0.088821685	0.062078026	0.021748011
<i>hsa-miR-501-3p</i>	2.569416333	2.157807658	2.347091562
<i>hsa-miR-501-5p</i>	0.015529878	0.059581299	0.035540789
<i>hsa-miR-5010-3p</i>	0.090892851	0.099382831	0.037961323
<i>hsa-miR-5010-5p</i>	0.645696251	0.471707183	0.508265532

<i>hsa-miR-502-3p</i>	0.399329837	0.602548049	0.529830489
<i>hsa-miR-503-5p</i>	0.865918697	0.774681588	0.859772225
<i>hsa-miR-504-5p</i>	0.133747837	0.113906494	0.158601937
<i>hsa-miR-505-3p</i>	0.583404791	0.689177857	0.627444019
<i>hsa-miR-505-5p</i>	1.26960196	0.980247662	1.290154889
<i>hsa-miR-511-5p</i>	0.925191629	0.521898548	1.024547071
<i>hsa-miR-514a-3p</i>	0.004578158	0.026620112	0.014484208
<i>hsa-miR-516b-5p</i>	0.022045415	0.022758269	0.014440989
<i>hsa-miR-5187-5p</i>	0.125674988	0.136057753	0.188206282
<i>hsa-miR-5189-3p</i>	0.243538348	0.160651777	0.197796008
<i>hsa-miR-5189-5p</i>	0.545057471	0.4239542	0.585135374
<i>hsa-miR-5193</i>	0.128480669	0.138929437	0.109912614
<i>hsa-miR-532-3p</i>	0.066329923	0.093983003	0.138962017
<i>hsa-miR-532-5p</i>	5.046854933	4.908952269	4.957287244
<i>hsa-miR-539-3p</i>	0.200121186	0.319648903	0.296716544
<i>hsa-miR-539-5p</i>	0.08056424	0.200298264	0.194507476
<i>hsa-miR-541-3p</i>	0.201197377	0.097978444	0.138817505
<i>hsa-miR-542-3p</i>	0.469787054	0.663860747	0.331618815
<i>hsa-miR-543</i>	3.606381998	3.602545825	3.351066667
<i>hsa-miR-548a-3p</i>	0.017807184	0.04217873	0.034329964
<i>hsa-miR-548ac</i>	0.028951219	0.034023571	0.018141281
<i>hsa-miR-548ar-3p</i>	0.015233492	0.093219394	0.025869436
<i>hsa-miR-548ay-3p</i>	0.016300283	0.025262184	0.034251861
<i>hsa-miR-548bc</i>	0.00751826	0.009044628	0.011034581
<i>hsa-miR-548e-3p</i>	0.515024243	0.595343238	0.512959043
<i>hsa-miR-548j-3p</i>	0.05038765	0.241507653	0.107777612
<i>hsa-miR-548j-5p</i>	1.379569932	1.304649817	1.391513425
<i>hsa-miR-548k</i>	0.271664317	0.426286451	0.289713728
<i>hsa-miR-548l</i>	0.187041998	0.196937095	0.254701752
<i>hsa-miR-548n</i>	0.056970373	0.037953287	0.058446109
<i>hsa-miR-548o-3p</i>	0.90949111	1.407327272	0.867581498
<i>hsa-miR-548q</i>	0.013125062	0.006089523	0.049216962
<i>hsa-miR-550a-3-5p</i>	0.435247004	0.495753628	0.506049003
<i>hsa-miR-550a-5p</i>	0.420626991	0.406763347	0.47529908
<i>hsa-miR-552-3p</i>	0.053138499	0.081379948	0.066515964
<i>hsa-miR-552-5p</i>	0.030680173	0.030972171	0.018446849
<i>hsa-miR-556-3p</i>	0.023707878	0.021589447	0.027585336
<i>hsa-miR-556-5p</i>	0.145965686	0.229778246	0.214908946
<i>hsa-miR-5582-3p</i>	0.015091117	0.032264706	0.017654704
<i>hsa-miR-5584-5p</i>	0.080334575	0.050728292	0.064222678
<i>hsa-miR-5588-5p</i>	0.028970721	0.009179733	0.0427136
<i>hsa-miR-5683</i>	0.04670187	0.03920083	0.033716954
<i>hsa-miR-5695</i>	0.013710376	0.048915695	0.03309806
<i>hsa-miR-5697</i>	0.083266311	0.030790742	0.043572425
<i>hsa-miR-5698</i>	0.030105476	0.082130549	0.110841657
<i>hsa-miR-570-3p</i>	0.015418844	0.019396022	0.028026393



<i>hsa-miR-574-3p</i>	0.726916127	0.643242732	0.706645772
<i>hsa-miR-574-5p</i>	0.057626899	0.156085287	0.128030899
<i>hsa-miR-576-3p</i>	0.767498487	0.649190568	0.559203215
<i>hsa-miR-576-5p</i>	0.382159238	0.589164984	0.490702483
<i>hsa-miR-579-5p</i>	0.071514099	0.04943914	0.090377043
<i>hsa-miR-580-3p</i>	0	0.051248566	0.022561969
<i>hsa-miR-581</i>	0.171771662	0.257571598	0.173800883
<i>hsa-miR-582-3p</i>	0.759141808	1.081792387	0.569410797
<i>hsa-miR-584-3p</i>	0.007774412	0.037035419	0.007420177
<i>hsa-miR-584-5p</i>	6.423029944	5.597128476	6.168936535
<i>hsa-miR-589-5p</i>	1.374681913	1.732130707	1.418577013
<i>hsa-miR-590-3p</i>	0.126410797	0.202999837	0.154250941
<i>hsa-miR-597-3p</i>	0.080691943	0.100001631	0.118993369
<i>hsa-miR-598-3p</i>	0.463195235	0.506338214	0.397399527
<i>hsa-miR-598-5p</i>	0.015996453	0.022599998	0.025388929
<i>hsa-miR-605-3p</i>	0.066468387	0.06121589	0.073709629
<i>hsa-miR-607</i>	0.094497979	0.173292878	0.145602879
<i>hsa-miR-610</i>	0.055333332	0.024632277	0.018694042
<i>hsa-miR-615-3p</i>	0.055405357	0.102183655	0.15729903
<i>hsa-miR-616-3p</i>	0.047685056	0.03200201	0.040064479
<i>hsa-miR-618</i>	0.122479758	0.163216045	0.163225868
<i>hsa-miR-624-5p</i>	0.064141543	0.067878431	0.09010013
<i>hsa-miR-625-3p</i>	2.492552337	2.172456514	2.142927522
<i>hsa-miR-625-5p</i>	0.124667394	0.100955617	0.093248585
<i>hsa-miR-627-3p</i>	0.03625319	0.022075523	0.048885534
<i>hsa-miR-627-5p</i>	0.025954338	0.022908995	0.01960795
<i>hsa-miR-628-3p</i>	1.749015105	1.5505368	1.735121108
<i>hsa-miR-628-5p</i>	0.197384601	0.263871957	0.336430801
<i>hsa-miR-629-3p</i>	0.053172847	0.026581456	0.010777916
<i>hsa-miR-629-5p</i>	5.65440754	4.962604784	5.562546726
<i>hsa-miR-636</i>	0.077575845	0.094038091	0.138450524
<i>hsa-miR-641</i>	0.439823396	0.727643367	0.426309321
<i>hsa-miR-642a-3p</i>	0.126134005	0.049448832	0.042174942
<i>hsa-miR-642b-3p</i>	0.063770601	0.015286284	0.068510444
<i>hsa-miR-6503-3p</i>	0.064682672	0.070384532	0.130284995
<i>hsa-miR-6503-5p</i>	0.007538834	0.022446882	0.035354616
<i>hsa-miR-6505-3p</i>	0.013532375	0.017482866	0.029780421
<i>hsa-miR-6505-5p</i>	0.017277362	0.030009434	0.02247858
<i>hsa-miR-6509-5p</i>	0.037892769	0.076606596	0.034293132
<i>hsa-miR-651-5p</i>	0.826404301	1.043284121	0.795622907
<i>hsa-miR-6511a-3p</i>	0.148576151	0.041058962	0.05381291
<i>hsa-miR-6511b-3p</i>	0.029271172	0.023130279	0.020264122
<i>hsa-miR-6513-3p</i>	0.085037647	0.092787284	0.079700497
<i>hsa-miR-6513-5p</i>	0.01018496	0.01844731	0.024789621
<i>hsa-miR-6514-3p</i>	0.010691843	0.050820706	0.021892155
<i>hsa-miR-6514-5p</i>	0.179083434	0.104330108	0.217596571

<i>hsa-miR-6515-5p</i>	0.487519657	0.507439673	0.510554244
<i>hsa-miR-6516-3p</i>	0.048903691	0.069678662	0.034930005
<i>hsa-miR-6516-5p</i>	0.242427376	0.317993669	0.357918438
<i>hsa-miR-652-3p</i>	1.40760421	1.902817151	1.777837409
<i>hsa-miR-654-3p</i>	2.46346809	2.352038563	2.220076149
<i>hsa-miR-654-5p</i>	2.001936725	2.268568278	2.144390154
<i>hsa-miR-655-3p</i>	0.025896693	0.083449494	0.030921721
<i>hsa-miR-656-3p</i>	0.216228795	0.26142271	0.162639029
<i>hsa-miR-659-5p</i>	0.104378002	0.26531101	0.130477161
<i>hsa-miR-660-5p</i>	0.670842589	1.000125132	0.68484289
<i>hsa-miR-664a-3p</i>	0.223154837	0.133774724	0.140338675
<i>hsa-miR-664a-5p</i>	2.947913821	1.927760931	2.457912997
<i>hsa-miR-664b-5p</i>	0.250249584	0.288769143	0.37645982
<i>hsa-miR-668-3p</i>	0.03956703	0.0470173	0.017030001
<i>hsa-miR-671-3p</i>	1.643748044	1.671463891	1.510310829
<i>hsa-miR-671-5p</i>	0.123497611	0.071601407	0.10713158
<i>hsa-miR-6716-3p</i>	0.041411151	0.110079643	0.084499904
<i>hsa-miR-6721-5p</i>	0.534828724	0.255219283	0.383443646
<i>hsa-miR-6726-3p</i>	0.08473333	0.020734926	0.049700166
<i>hsa-miR-6727-5p</i>	0.077320496	0.017215205	0.039049645
<i>hsa-miR-6729-5p</i>	0.037339585	0.00536761	0.007007493
<i>hsa-miR-6733-5p</i>	0.027574806	0.011103446	0.036721489
<i>hsa-miR-6734-5p</i>	0.294814048	0.403854451	0.277145805
<i>hsa-miR-6735-5p</i>	0.243207169	0.097749007	0.154654415
<i>hsa-miR-6736-5p</i>	0.083103824	0.046147021	0.094259505
<i>hsa-miR-6737-3p</i>	0.024698859	0.023318179	0.016174228
<i>hsa-miR-6738-3p</i>	0.073636979	0.114718143	0.07139705
<i>hsa-miR-6741-3p</i>	0.488980506	0.23150394	0.300320593
<i>hsa-miR-6741-5p</i>	0.926578592	0.716168252	0.836135447
<i>hsa-miR-6747-3p</i>	0.666072076	0.603704426	0.631831041
<i>hsa-miR-6750-5p</i>	0.035512793	0.03558253	0.061251406
<i>hsa-miR-6755-5p</i>	0.085808052	0.031500452	0.042232363
<i>hsa-miR-6763-5p</i>	0.079292653	0.053804454	0.085662283
<i>hsa-miR-6764-5p</i>	0.04675283	0.022097748	0.049367434
<i>hsa-miR-6767-5p</i>	0.104787693	0.049119603	0.079978028
<i>hsa-miR-6770-3p</i>	0.021730447	0.038514559	0.064476631
<i>hsa-miR-6772-3p</i>	0.37878063	0.449414576	0.276221467
<i>hsa-miR-6772-5p</i>	0.072800286	0.034704291	0.050957027
<i>hsa-miR-6775-3p</i>	0.024641737	0.033780326	0.035469943
<i>hsa-miR-6780a-5p</i>	0.164242328	0.236388246	0.244986249
<i>hsa-miR-6783-3p</i>	0.049296764	0.048050921	0.031567908
<i>hsa-miR-6783-5p</i>	0.031779333	0.027299642	0.004727054
<i>hsa-miR-6785-5p</i>	0.058078717	0.01715337	0.031522201
<i>hsa-miR-6786-3p</i>	0.015478863	0.05142891	0.030051715
<i>hsa-miR-6789-3p</i>	0.019315182	0.032406429	0.032396126
<i>hsa-miR-6791-5p</i>	0.053222014	0.010580384	0.030867806



<i>hsa-miR-6793-5p</i>	0.047514422	0.068883272	0.043130639
<i>hsa-miR-6802-5p</i>	0.108867374	0.018318045	0.083221269
<i>hsa-miR-6803-3p</i>	0.085153926	0.03238459	0.051368228
<i>hsa-miR-6804-5p</i>	0.054993092	0.045895233	0.036916059
<i>hsa-miR-6805-5p</i>	0.199382031	0.202748464	0.202269506
<i>hsa-miR-6806-3p</i>	0.073996408	0.129465041	0.073157953
<i>hsa-miR-6808-3p</i>	0.042343615	0.057961533	0.023632252
<i>hsa-miR-6809-5p</i>	0.116032856	0.099301469	0.087087411
<i>hsa-miR-6810-3p</i>	0.024324507	0.042507751	0.014184501
<i>hsa-miR-6810-5p</i>	0.03595625	0.035513574	0.043414315
<i>hsa-miR-6813-5p</i>	0.30186357	0.114303842	0.288932056
<i>hsa-miR-6815-5p</i>	0.08558496	0.118040068	0.09425982
<i>hsa-miR-6818-5p</i>	0.011992078	0.007551332	0.029288999
<i>hsa-miR-6819-3p</i>	0.03767002	0.087889435	0.09392932
<i>hsa-miR-6819-5p</i>	0.042304936	0.038701764	0.063580315
<i>hsa-miR-6825-5p</i>	0.054653033	0.025857358	0.008859016
<i>hsa-miR-6827-5p</i>	0.012823683	0.014579778	0.019472903
<i>hsa-miR-6837-3p</i>	0.193481265	0.134876798	0.255600173
<i>hsa-miR-6837-5p</i>	0.035600888	0.011688222	0.027568805
<i>hsa-miR-6842-3p</i>	1.032933123	1.265899523	1.05059035
<i>hsa-miR-6842-5p</i>	0.321721374	0.213599296	0.372795213
<i>hsa-miR-6843-3p</i>	0.475573271	0.896429141	0.475152406
<i>hsa-miR-6847-5p</i>	0.109143296	0.060058193	0.044644551
<i>hsa-miR-6850-5p</i>	0.033508782	0.093155602	0.044832966
<i>hsa-miR-6852-3p</i>	0.724308681	0.640712897	0.743557425
<i>hsa-miR-6852-5p</i>	1.70398564	1.456575732	1.810333872
<i>hsa-miR-6855-3p</i>	0.014052075	0.007065486	0.013005902
<i>hsa-miR-6855-5p</i>	0.074163678	0.091359194	0.165930863
<i>hsa-miR-6857-3p</i>	0.05791385	0.047063771	0.013198582
<i>hsa-miR-6861-5p</i>	0.033205915	0.009569358	0.034753277
<i>hsa-miR-6862-5p</i>	0.146170923	0.045124167	0.156873369
<i>hsa-miR-6865-5p</i>	0.070050871	0.019914205	0.014685693
<i>hsa-miR-6866-5p</i>	0.361386611	0.455678688	0.268335806
<i>hsa-miR-6868-3p</i>	0.151439397	0.300863939	0.132291628
<i>hsa-miR-6873-3p</i>	0.030758558	0.048075906	0.024499171
<i>hsa-miR-6875-5p</i>	0.041040941	0.016912516	0.054039752
<i>hsa-miR-6877-5p</i>	0.403867677	0.160963317	0.221614645
<i>hsa-miR-6882-5p</i>	0.043957108	0.088149178	0.05672566
<i>hsa-miR-6884-5p</i>	0.134170314	0.093149925	0.09680525
<i>hsa-miR-6891-5p</i>	0.104609402	0.016564601	0.062684872
<i>hsa-miR-6894-3p</i>	0.085286644	0.030588044	0.04431971
<i>hsa-miR-6894-5p</i>	0.015262852	0.026846213	0.019036301
<i>hsa-miR-7-1-3p</i>	0.092761025	0.07039911	0.042458442
<i>hsa-miR-7-5p</i>	3.393475884	3.721544276	3.555919828
<i>hsa-miR-7107-3p</i>	0.094371029	0.074500759	0.072783916
<i>hsa-miR-7110-3p</i>	0.081823712	0.023084801	0.026154966

<i>hsa-miR-7110-5p</i>	0.044596465	0.012208271	0.019093379
<i>hsa-miR-7113-5p</i>	0.033783098	0.041115001	0.073256919
<i>hsa-miR-7151-3p</i>	0.085012753	0.023739598	0.049372028
<i>hsa-miR-7155-3p</i>	0.023746251	0.097361221	0.015505849
<i>hsa-miR-7155-5p</i>	0.116673542	0.058881591	0.064004993
<i>hsa-miR-744-3p</i>	0.106860468	0.119820508	0.092975211
<i>hsa-miR-744-5p</i>	6.509652341	5.812891587	6.365037842
<i>hsa-miR-758-3p</i>	0.191753626	0.487829358	0.244616119
<i>hsa-miR-760</i>	0.887731698	0.419138757	0.720674086
<i>hsa-miR-766-3p</i>	0.492575124	0.451079689	0.485051612
<i>hsa-miR-766-5p</i>	1.727625697	1.24026113	1.636553191
<i>hsa-miR-769-5p</i>	1.247807197	1.467968413	1.386911626
<i>hsa-miR-7705</i>	0.005804262	0.021675534	0.025918428
<i>hsa-miR-7706</i>	0.873552608	0.994601248	0.992599523
<i>hsa-miR-7848-3p</i>	0.116645717	0.07746099	0.077623123
<i>hsa-miR-7849-3p</i>	0.312437792	0.251435008	0.25288881
<i>hsa-miR-7851-3p</i>	0.03202723	0.011259723	0.051702566
<i>hsa-miR-7854-3p</i>	0.258184295	0.151342236	0.248869335
<i>hsa-miR-7855-5p</i>	0.013953804	0.031314321	0.023361423
<i>hsa-miR-7856-5p</i>	0.067374026	0.012487177	0.064738656
<i>hsa-miR-7976</i>	0.535131035	0.714855668	0.587590085
<i>hsa-miR-873-3p</i>	0.015188684	0.016301092	0.040396551
<i>hsa-miR-874-3p</i>	0.381191431	0.497706985	0.519568194
<i>hsa-miR-877-5p</i>	1.207975333	0.731997018	1.041920169
<i>hsa-miR-885-3p</i>	0.08195647	0.066775155	0.262971223
<i>hsa-miR-885-5p</i>	0.036549446	0.0665939	0.132965412
<i>hsa-miR-889-3p</i>	1.599854324	1.721375908	1.408415521
<i>hsa-miR-9-3p</i>	0.044218612	0.015304063	0.029426386
<i>hsa-miR-9-5p</i>	0.203904146	0.201557651	0.257673719
<i>hsa-miR-92a-1-5p</i>	0.175813346	0.099895625	0.123827186
<i>hsa-miR-92a-3p</i>	8.730309449	8.606346006	8.640140017
<i>hsa-miR-92b-3p</i>	1.498643661	0.853617036	1.241190026
<i>hsa-miR-92b-5p</i>	0.669783315	0.483583648	0.762946237
<i>hsa-miR-93-3p</i>	0.398571578	0.446397659	0.412508376
<i>hsa-miR-93-5p</i>	4.35072387	4.582755596	4.517573691
<i>hsa-miR-933</i>	0.034072914	0.04810138	0.02599308
<i>hsa-miR-937-3p</i>	0.186387129	0.143712098	0.124343999
<i>hsa-miR-939-5p</i>	0.664049465	0.71067983	0.609472028
<i>hsa-miR-941</i>	1.030802627	1.216521092	1.281790455
<i>hsa-miR-942-3p</i>	0.068792207	0.07894441	0.014382061
<i>hsa-miR-942-5p</i>	1.048569619	1.148038291	1.166501446
<i>hsa-miR-943</i>	0.061383024	0.041086237	0.068807968
<i>hsa-miR-95-3p</i>	0.619610823	0.411579971	0.59005688
<i>hsa-miR-96-5p</i>	0.231939428	0.559082686	0.385467824
<i>hsa-miR-98-3p</i>	0.381551641	0.402758415	0.338273843
<i>hsa-miR-98-5p</i>	4.752239335	4.887842193	4.962314586

<i>hsa-miR-9903</i>	0.011458518	0.018040772	0.028146296
<i>hsa-miR-99a-5p</i>	6.02536073	6.084480543	6.058885432
<i>hsa-miR-99b-3p</i>	1.325412728	1.083759886	1.213070141
<i>hsa-miR-99b-5p</i>	5.329587801	4.824830999	4.973108281

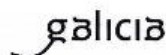


## 8.2 COMITÉ ÉTICO



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
teléfono: 881542/28 - fax: 881542/29  
www.sergas.es



### DICTAMEN DEL COMITÉ AUTONÓMICO DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia,

#### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 29/07/2014 el estudio:

**Título:** Monitorización de la función cardíaca durante el tratamiento con agentes cardiotóxicos en la terapia antineoplásica

**Promotor:** Sergio Raposeiras Roubín

**Código del Promotor:**

**Código de Registro:** 2014/362

Y que este Comité, teniendo en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, a las muestras o registros, **SOLICITA LAS SIGUIENTES ACLARACIONES:**

- Se recuerda al equipo investigador que el estudio ha de ser presentado ante la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios para su clasificación y registro según la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios posautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano (más información en <http://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/medicamentos/estudiosPosautorizacion.htm>).
- Consideramos que deben detallar en el protocolo el número de visitas y las pruebas a realizar en las mismas durante el tiempo de seguimiento de los participantes (en especial aquellos procedimientos que sean extraordinarios o fuera de la práctica clínica habitual). Documentos de consentimiento informado: Recomendamos que eliminen de beneficios las pruebas y conocer sus resultados, dado que sería concisión del estudio.



#### Y HACE CONSTAR QUE:

1. El CAEIG cumple los requisitos legales vigentes (R.D 223/2004 por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).
2. El CAEIG tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del CAEIG es:

Manuel Portela Romero. (Presidente). Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.  
Paula M<sup>a</sup> López Vázquez. (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.  
Juan Vázquez Lago. (Secretario Suplente). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.  
Jesús Alberdi Sudupe. Médico especialista en Psiquiatría.  
Rosendo Bugarrín Gorzález. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.  
Xoán X. Casas Rodríguez. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Juana M<sup>a</sup> Cruz del Río. Trabajadora Social.  
Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.  
José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.  
José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.  
Marta Gil Pérez. Licenciada en Derecho. Miembro externo.  
Pilar Gayoso Diz. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Agustín Pita Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria.  
Salvador Pita Fernández. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.  
Susana María Romero Yuste. Médico Especialista en Reumatología.  
Teresa Vázquez Pumarín. Diplomada Universitaria de Enfermería.  
M<sup>a</sup> Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica.

En Santiago de Compostela, a 31 de julio de 2014

Paula M. López Vázquez



## DICTAMEN DEL COMITÉ AUTONÓMICO DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Autonomo de Ética de la Investigación de Galicia,

### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 26/04/18, la enmienda del estudio:

**Título:** Monitorización de la función cardíaca durante el tratamiento con agentes cardiotóxicos en la terapia antineoplásica

**Versión Enmienda:** cambio de promotor e IP (Ricardo Lage Fernández) y nueva HIP/CI

**Tipo de estudio:** EPA-SP

**Promotor:** Ricardo Lage Fernández

**Código del Promotor:** SRR-ONC-2014-01

**Código de Registro:** 2014/362

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha enmienda sea incorporada al estudio de investigación que se está realizando en los centros aprobados.

Centros	Investigadores principales
C.H. Universitario de Santiago	Ricardo Lage Fernández

NOTA: Es preciso que mantengan en el modelo de la hoja de consentimiento informado, tal como estaba en la versión previa, la opción a que el participante acceda o no a que sean conservadas una vez terminado el estudio. Remitir el modelo definitivo para archivo en la documentación del estudio.

**Y HACE CONSTAR QUE:**

- 1 El CAEIG cumple los requisitos legales vigentes (R.D 1090/2015 y la Ley 14/2007).
- 2 El CAEIG tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
- 3 La composición actual del CAEIG es:

Susana María Romero Yuste (Presidenta). Médico Especialista en Reumatología.  
Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.  
Paula Mª López Vázquez, (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.  
Juan Vázquez Lago (Secretario Suplente). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.  
Jesús Alberdi Sudupe. Médico especialista en Psiquiatría.  
Rosendo Bugarín González. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.  
Nuria Carballada Feijóo. Miembro lego. Representante de los intereses de los pacientes.  
Juana Mª Cruz del Río. Trabajadora Social.  
Ana Belén Cruz Valiño. Licenciada en Derecho.  
Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.  
José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.  
José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.  
Mª José Ferreira Díaz. Diplomada Universitaria de Enfermería.  
Pilar Gayoso Diz. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Manuel Portela Romero. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.  
Agustín Pía Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria.  
Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.  
Diego Santos García. Médico Especialista en Neurología.  
Mª Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica

En Santiago de Compostela, a 30 de abril de 2018



## 8.4 PUBLICACIONES

Omentin protects H9c2 cells against docetaxel cardiotoxicity

Ricardo Lage<sup>1,2,#,\*</sup>, María Cebro-Márquez<sup>1,#</sup>, Moisés Rodríguez-Mañero<sup>2,3</sup>, José Ramón González-Juanatey<sup>1,2,3</sup>, Isabel Moscoso<sup>1,2,\*</sup>

#Igual contribución

\*Autores corresponsales

1 Grupo de Cardiología, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular e Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela e Fundación Instituto de Investigación de Santiago de Compostela—Santiago de Compostela, España,

2 Centro de Investigación Biomédica en Rede de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, España,

3 Departamento de Cardiología e Unidade Coronaria, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

Publicado en Plos One en febreiro do 2019, acceso aberto (*Creative Commons Attribution*)

Índice de Impacto 2,74 (Q2); ISSN 1932-6203

Contribución feita por María Cebro-Márquez: conceptualización, análise de datos, análise formal, investigación, metodoloxía, recursos, *software*, validación e escritura.



## RESEARCH ARTICLE

## Omentin protects H9c2 cells against docetaxel cardiotoxicity

Ricardo Lage<sup>1,2,4\*</sup>, María Cebro-Márquez<sup>1,4</sup>, Moisés Rodríguez-Mañero<sup>2,3</sup>, José Ramón González-Juanatey<sup>1,2,3</sup>, Isabel Moscoso<sup>1,2,4</sup>

**1** Cardiology Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela and Health Research Institute, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela—Santiago de Compostela, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, Spain, **3** Department of Cardiology and Coronary Unit, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

\* These authors contributed equally to this work.  
\* [rlage@gmail.com](mailto:rlage@gmail.com) (RL); [moscoso@gmail.com](mailto:moscoso@gmail.com) (IM)



## Abstract

## Background

Association between obesity and cardiovascular diseases is well known, however increased susceptibility of obese patients to develop several cancer types is not so commonly known. Current data suggest that poorer overall survival in cancer patients might be associated to non-cancer-related causes such as higher risk of cardiotoxicity in obese patients treated with chemotherapeutic agents. Omentin, a novel adipokine decreased in obesity, is actually in the spotlight due to its favourable effects on inflammation, glucose homeostasis and cardiovascular diseases. Also, recent data showed that *in vitro* anthracycline-induced cardiomyocyte apoptosis is counteracted by omentin suggesting its cardioprotective role.

## Objective

Our aim was to evaluate omentin effects against docetaxel toxicity.

## Results

Our data indicate that omentin inhibits docetaxel-induced viability loss and that increased viability is associated to decreased caspase-3 expression and cell death. Although omentin reduces NOX4 expression, it failed to reduce docetaxel-induced reactive oxygen species production. Our results indicate that omentin decreases docetaxel-induced endoplasmic reticulum stress, suggesting that cardioprotective role might be associated to ERS inhibition.

## Conclusion

These data suggest that omentin treatment may contribute to decrease susceptibility to DTX-induced cardiotoxicity.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Lage R, Cebro-Márquez M, Rodríguez-Mañero M, González-Juanatey JR, Moscoso I (2019) Omentin protects H9c2 cells against docetaxel cardiotoxicity. PLoS ONE 14(2): e0212782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212782>

**Editor:** Patha Mukhopadhyay, National Institutes of Health, UNITED STATES

**Received:** September 6, 2018

**Accepted:** February 8, 2019

**Published:** February 22, 2019

**Copyright:** © 2019 Lage et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Fundación Mutua Madrileña 2014 (R.L.), Red de Investigación Cardiovascular (RIC) (RD120042/0039) an initiative of ISCIII (J.R.G.-J.), Programa de Consolidación de Unidades de Investigación Competitivas del SUG (GPC 2013-051) of Xunta de Galicia (J.R.G.-J.) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades

Cardiovascular (CIBERCV) (CB16/11/00226) of Instituto de Salud Carlos III (J.R.G.-J). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Obesity has become a worldwide epidemic, and its prevalence has been projected to grow by 40% in the next decade [1]. A follow-up analysis from the Framingham study established obesity as an independent risk factor for developing heart failure (HF), coronary artery disease (CAD), stroke, and overall cardiovascular disease (CVD) death, but is also associated with a higher prevalence of comorbidities such as diabetes, hypertension, and metabolic syndrome, which finally increase the risk for CVD [2].

Although the association between obesity and CVDs is widely known, increased cancer susceptibility of patients with obesity is not so commonly reported. Obesity has been strongly associated with cancer occurrence [3], shorter time to recurrence and with increased cancer mortality [3, 4]. Current data indicate that poorer overall survival might be associated to non-cancer-related causes such as higher probability of cardiac adverse events in patients with obesity compared to lean subjects after treatment with chemotherapeutic agents [5].

Steady progress in anticancer agents development has led to a significant increase in patients survival from which has emerged the need to increase the knowledge of comorbidities and medical complications associated or caused by chemotherapy treatments. Adverse cardiovascular events are the major cause of morbidity and mortality in early-diagnosed breast cancer survivors. A recent meta-analysis indicates that overweight and obesity are risk factors for cardiotoxicity (CT) in breast cancer patients [6]. In addition, increased sensitivity to cardiac systolic impairment and cardiomyocyte mitochondrial dysfunctions have been demonstrated in murine models of obesity treated with anthracyclines [7, 8]. In opposition to the conventional perspective as a passive reservoir for energy storage, adipose tissue is actually recognized as an endocrine organ that expresses and secretes a variety of bioactive peptides, known as adipokines, with deleterious or beneficial effects on cardiovascular system. Recent data placed the altered endocrine function of adipose tissue in patients with obesity into the spotlight as a potential mechanism in the relationship between obesity and CT [9, 10]. Among the "good" adipokines, omentin (OMT) is actually attracting much attention due to its favourable effects on inflammation, glucose homeostasis and CVD. Low levels of OMT are linked to CAD, HF, acute myocardial infarction (AMI) and ischemic disease in patients with type 2 diabetes mellitus [11, 12]. In addition, regarding the mechanism of action at the molecular level of OMT, Kataoka *et al.* described that through AMPK and Akt signalling, OMT is able to protect cardiomyocytes from apoptosis ischemia/reperfusion injury [13]. It has been also reported that plasma OMT-1 levels are significantly decreased in patients with obesity [14]. Recent data showed that *in vitro* anthracycline-induced cardiomyocyte apoptosis is counteracted by OMT through the inhibition of oxidative stress suggesting that defective levels of OMT in obese subjects, in addition to obesity-related carcinogenesis, [15] might contribute to chemotherapy-induced CT [10]. Although more recently developed chemotherapy agents are emerging less cardiotoxic, it is being difficult to completely remove CT when using classic chemotherapy [16]. Docetaxel (DTX) is a second-generation taxane, effectively used against different types of cancers [17], that stabilizes the  $\beta$ -tubulin subunit of microtubules, preventing depolymerization of the mitotic spindle. Taxanes promote bradycardia and tachyarrhythmias, myocardial ischemia and heart failure [18, 19]. At molecular level, taxanes are capable to activate several apoptosis pathways [17, 20]. Since OMT counteracts doxorubicin-induced apoptosis, the aim of our study is to evaluate the possible cardioprotective effects of OMT against DTX-induced apoptosis.

## Materials and methods

### Cell culture and reagents

Rat ventricular cardiomyoblast cells (H9c2) were used as an alternative to primary cardiomyocytes, these cells maintain morphological characteristics of immature embryonic cardiomyocytes with electrical and hormonal signal pathway elements of adult cardiac cells [21], in addition to energetic similarities to primary cardiomyocytes [22]. H9c2 were cultured in 0.1% gelatine coated plates with DMEM medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) and 2mM L-glutamine, in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. H9c2 were seeded at least 24h before treatments unless otherwise indicated and the experimental procedures were conducted upon reaching 80% confluence.

Cells were treated with OMT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), N-Acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma-Aldrich) and DTX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at indicated concentrations. Control groups were treated with respective culture medium and vehicle.

### Flow cytometry analysis of ROS

H9c2 cells were incubated during 24 hours with 25nM DTX and/or 300ng/ml OMT and/or 1h of pre-treatment with 4mM NAC in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. H9c2 cell cultures were washed in PBS, trypsinized and resuspended in HBSS phenol-red-free medium (Sigma-Aldrich) at  $5 \times 10^5$  cells/mL. Samples were incubated at 37°C in the dark with 5µM dihydroethidium (DHE) for 30 min (Sigma-Aldrich). DHE is a specific biomarker of total superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). After incubation, cells were washed twice in cold PBS to eliminate excess staining solution. ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) was measured by flow cytometry analysis of 5000-gated cells using FACScan and CellQuestPro software from Becton Dickinson (Fullerton, CA, USA) in channel FL2. The autofluorescence in each sample was subtracted.

### Cell viability

Cell viability was measured using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Briefly, H9c2 cells were seeded at a density of 5000 cells/well in 96-well plates. Cells were treated with 25nM DTX and/or 300ng/ml OMT in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. After, MTT (0.5 mg/ml) was added and incubated at 37°C during 4 hours. Formazan crystals were solubilized with dimethyl sulfoxide (DMSO) and isopropanol (1:1). The optical density (OD) was measured at a wavelength of 570nm and 690nm using an automated microplate reader.

### Flow cytometry of apoptosis

Apoptosis was measured by using FITC Annexin-V-FLUOS staining Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol. H9c2 cells were incubated during 24 hours with 25nM DTX and/or 300ng/ml OMT in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Then, cells were collected by trypsinization and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. Following suspension in binding buffer, cells were labelled with Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) according to the manufacturer's instructions. FITC and PI were measured by flow cytometry analysis of 5000-gated cells using FACScan and CellQuestPro software from Becton Dickinson (Fullerton, CA, USA). Cells populations were defined as necrotic (PI+), apoptotic (AV+/PI+) or early apoptotic (AV+) cells.

### Real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from cell culture using *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), according to the manufacturer's recommendations. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, MA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The resulting cDNA was subjected to Real-time PCR using *FastStart Universal SYBR Green Master (RoX)* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) was performed using specific primers (S1 Table). All reactions were carried out in an *Eppendorf Realplex thermocycler*. Sample values were standardized versus an indicated housekeeping gene.

### Western blot

H9c2 cells were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l EDTA, 1% Triton X-100, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 50 mmol/l sodium fluoride, 5 mmol/l sodium pyrophosphate, 0.27 mol/l sucrose, 0.1% 2-mercaptoethanol, and 1x *Complete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 1 hour. Homogenates were centrifuged at 21,100g for 15 min at 4°C; supernatants were removed, and frozen at -20°C. Cells lysates (15 µg) were subjected to 13% acrylamide SDS-PAGE gels, transferred on a PVDF membrane as previously described. Membranes were blocked for 1 hour in TBS-Tween (TBST: 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 mol/l NaCl and 0.1% Tween) containing 3% BSA and probed with primary antibodies (S2 Table). Detection of proteins was performed using appropriate secondary antibody (S2 Table) and an enhanced chemiluminescence reagent *Pierce-ECL western blotting substrate* (Thermo Scientific, MA, USA).

Representative blots correspond to unedited images of full radiographic film detection. Each band is accompanied by its respective load control.

Densitometry analysis was performed using *ImageJ-1.33* software (NIH, Bethesda, MD, USA). First, each blot is relativized to a background value obtained from an identical adjacent area to consider any background variation in the radiographic signal. Each blot is then individually relativized versus its control to avoid any load variation between samples. Mean of 3 samples was used as experimental group value for each single experiment ( $n = 3$ ).

### Statistical analysis

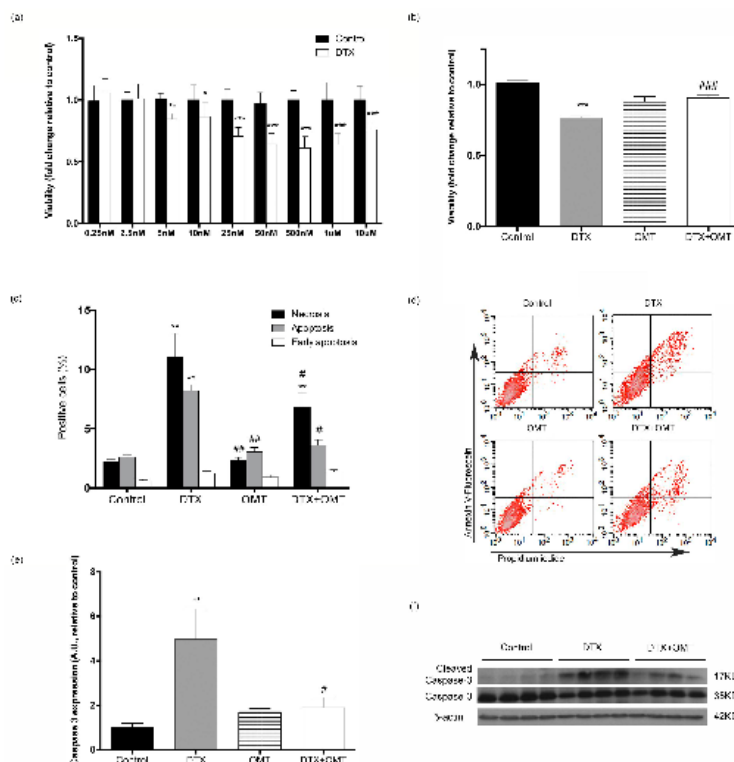
Data are represented as mean  $\pm$  SEM (standard error of the media). Statistical significance was determined by Mann-Whitney, ANOVA followed by Tukey's or Dunn's post hoc test or two-way Student's t-test determined by using *GraphPad Prism 6 Software*.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### Effects of DTX and OMT treatment in H9c2 cell viability and apoptosis

Viability of H9c2 cardiomyoblast cells was evaluated after 24h exposure to different concentrations of DTX by using MTT assays. As shown in Fig 1A, docetaxel decreased H9c2 cell viability in a dose-dependent manner. Based on the extremely significant decrease of the viability (Control:  $1.00 \pm 0.03$ ,  $n = 8$  vs. DTX:  $0.71 \pm 0.25$ ,  $n = 8$ , Fig 1A), 25 nM of DTX was selected as cardiotoxic concentration. H9c2 cells were co-treated with 300 ng/ml during 24h based on previously described antiapoptotic role of omentin [23]. OMT counteracted DTX-induced decrease in H9c2 viability (DTX:  $0.76 \pm 0.13$ ,  $n = 3$  vs. DTX+OMT (300 ng/ml):  $0.97 \pm 0.11$ ,  $n = 3$ , Fig 1B).

Flow cytometry apoptosis assay showed that the treatment of H9c2 cells with DTX increases necrosis and apoptosis compared to control group (Fig 1C and 1D). After 24 hours of OMT co-treatment both necrosis (Control;  $2.21 \pm 0.23$ ,  $n = 7$  vs. DTX;  $11.09 \pm 1.95$ ,  $n = 7$  vs. DTX



**Fig 1. Effect of OMT in viability, apoptosis and Caspase 3 expression in H9c2 cells exposed to DTX.** (A) Histograms showing cell viability measured by MTT assay in H9c2 cell treated with DTX after 24 h. (B) MTT cell viability assay in H9c2 cells treated with DTX and/or OMT after 24 hours. (C) Annexin V flow cytometry assay on H9c2 cell treated with DTX and/or OMT. (D) Representative density plots images of Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) double staining flow cytometry. (E) Caspase-3 levels in H9c2 cells treated with DTX and/or OMT after 24 hours. (F) Representative western blot autoradiographic images. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of three or four independent experiments. Statistical significance: \*, \*\* and \*\*\*  $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001 vs. control; #, ##, ###  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 DTX-OMT vs. DTX.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212782.g001>

+OMT;  $6.84 \pm 1.15$ ,  $n = 7$ ) and apoptosis (Control;  $2.62 \pm 0.28$ ,  $n = 7$  vs. DTX;  $8.22 \pm 0.48$ ,  $n = 7$  vs. DTX+OMT;  $3.63 \pm 0.46$ ,  $n = 7$ ) have been significantly reduced. Early apoptosis was not affected after any of the treatments (Fig 1C and 1D).

We next examined the effects of OMT co-treatment on DTX-induced caspase-3 activation (ratio 17KDa/35KDa) as a major effector of cell death. H9c2 cardiac cells were co-treated with OMT (300 ng/ml, 24h) and DTX. OMT counteracted caspase-3 activation induced by DTX (DTX;  $4.97 \pm 1.37$ ,  $n = 3$  vs. DTX+OMT;  $1.91 \pm 0.44$ ,  $n = 3$ , Fig 1E and 1F).

### Effects of OMT on DTX-induced ROS production, NADPH oxidases, CAT, GPx and SOD1 expression in H9c2 cells

Intracellular ROS levels were assessed by DHE in H9c2 cell treated with DTX and OMT. While NAC supplementation significantly reduced ROS levels (NAC;  $1.29 \pm 0.14$ ,  $n = 3$  vs. DTX;  $6.64 \pm 0.42$  vs control and DTX,  $n = 3$ , Fig 2A and 2B); OMT co-treatment does not affect DTX-induced ROS levels (DTX;  $8.81 \pm 0.64$  relative to control,  $n = 3$  vs. DTX+OMT;  $8.53 \pm 1.60$ ,  $n = 3$ , Fig 2A and 2B).

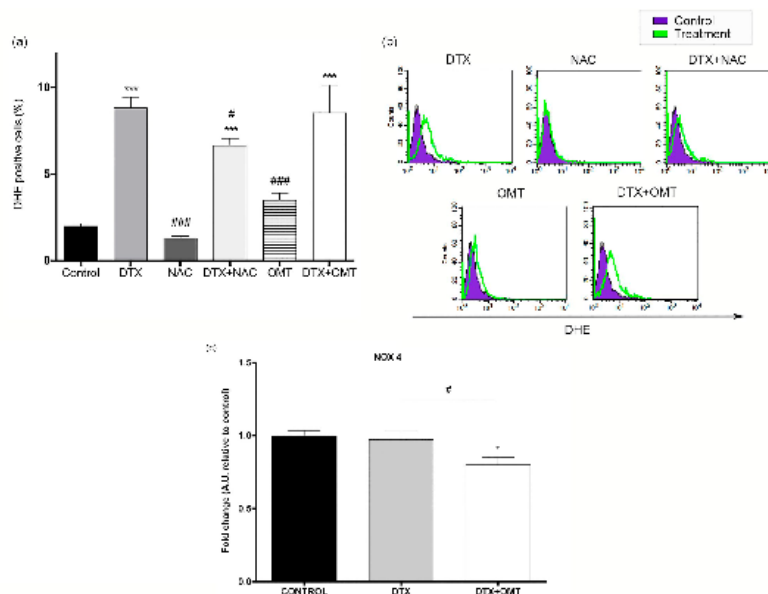
Previous data showed that DTX increase endothelial ROS formation through NOX4 [24]. However our results failed to show increased expression of studied NOX isoforms (NOX1, NOX2 and NOX4) in DTX-H9c2 treated cells. Curiously, our results showed a marked decrease in NOX4 expression in co-treated cells (DTX;  $0.97 \pm 0.06$  vs. DTX+OMT;  $0.80 \pm 0.05$ , Fig 2C) but any of the other analysed isoforms showed a regulation of gene expression after co-treatment (data not shown). Our results suggest that increased ROS levels are not directly associated with NOX isoforms expression.

Because DTX-induced toxicity is known to disturb the intracellular redox balance and to cause oxidative stress in endothelial cells [24], antioxidant enzyme expressions including superoxide dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were determined. As shown in Fig 3, statistical differences were found after DTX treatment in CAT and GPx gene expression, but failed to show any difference in SOD1 expression (Fig 3A–3C). We have also analyzed SOD1, CAT and GPx protein expression; surprisingly we only found statistical differences in SOD1 expression after DTX treatment (Fig 3D–3F). Catalase, SOD1 and glutathione levels were not affected by OMT supplementation in H9c2 cells (Fig 3A–3F).

### Effects of OMT on DTX-induced endoplasmic reticulum stress (ERS)

Due to the fact that ERS is one of the possible molecular mechanisms of cardiac toxicity [25, 26], we studied whether DTX induces ER stress in our *in vitro* model. Our results showed significantly decreased expression of BIP in addition to increased expression of ATF6 and CHOP indicating that DTX triggers ERS. We next examined if decreased cell death observed in H9c2 cells co-treated with DTX and OMT might be mediated by a reduction in ERS. Our data showed that co-treatment with OMT counteract DTX-induced regulation of ERS genes. OMT co-treatment, in addition to decrease CHOP and ATF6 and increase BIP expression, is capable to induce overexpression of GADD34 ( $n = 3$ , Fig 4A–4F). We have also analysed protein, according to gene expression analysis, we found that DTX-induced overexpression of ATF6 $\alpha$ , p $\text{eIF}2\alpha$ / $\text{eIF}2\alpha$  and BIP is counteracted by OMT ( $n = 3$ , Fig 4G–4I).

Our data suggest that ERS relieve is not associated with quenching ROS excess by omentin since co-treatment, in our conditions, counteracts ERS but does not reduce ROS levels. However, we wanted to assess this point by using pharmacological ROS scavenger NAC. Our data show that reduction of oxidative stress associated with NAC treatment reduces gene expression of CHOP and protein of ATF6 induced by DTX, but not the other previously described ERS proteins ( $n = 3$ , S1A–S1I Fig).



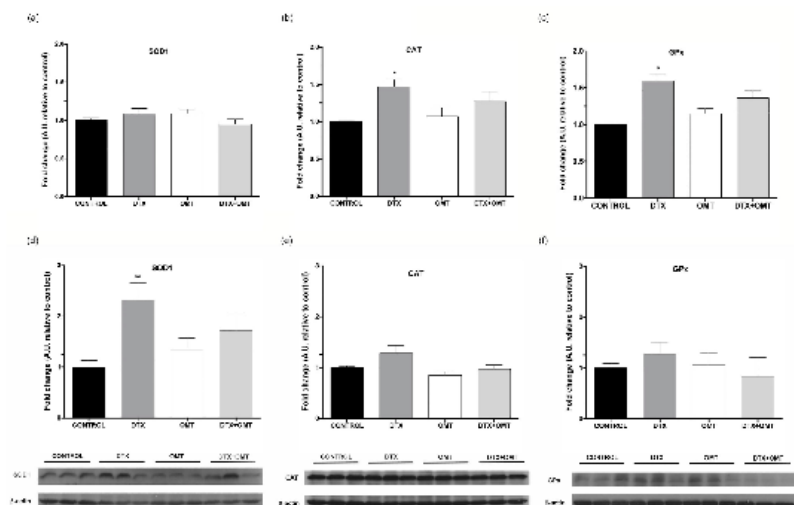
**Fig 2.** Effect of OMT on ROS production and NADPH oxidase (NOX4) expression in H9c2 treated with DTX. (A) ROS levels determined by flow cytometry using DHE staining in H9c2 cells treated with DTX and/or OMT after 24 hours and/or pre-treated with NAC for 1h. (B) Representative histogram images of DHE staining. (C) Histograms showing NOX4 mRNA expression measured by real-time polymerase chain reaction in H9c2 cells treated with DTX after 24h. Data represent the means  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. Statistical significance \*, \*\*, and \*\*\*  $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001 vs. control; #, ##, and ###  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 DTX-OMT vs. DTX.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212782.g002>

## Discussion

Worldwide obesity prevalence is estimated to reach 40% during the next decade. In addition to contributing to cardiovascular disease, obesity has been strongly associated with increased cancer incidence, particularly in postmenopausal women [3]. Although molecular mechanisms linking obesity and cancer risk/prognosis are not fully elucidated, obesity creates a host environment characterized by low-grade systemic inflammation, disturbed sex steroid signaling and increased insulin/insulin-like growth factors that may promote malignant cell growth and progression. Obesity is also associated with shorter time to disease recurrence, greater mortality [3, 4] and is an important prognostic factor of cardiotoxic events independent of treatment dose [27]. Recent data suggest that increased mortality in cancer patients might be associated to non-cancer-related causes of death such as higher probability of cardiac adverse events in patients with obesity treated with cardiotoxic agents [5].





**Fig 3.** Effect of OMT in CAT, GPx and SOD1 antioxidant enzymes gene and protein expression in H9c2 treated with DTX. mRNA levels of (A) CAT, (B) GPx and (C) SOD1 determined by real-time RT-PCR and protein levels of (D) CAT, (E) GPx and (F) SOD1 determined by Western blot in H9c2 cells treated with DTX and/or OMT after 24 hours. Data represent the means  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. Statistical significance: \*, \*\* and \*\*\*  $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001 vs. control; #, ##, and ###  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 DTX-OMT vs. DTX.

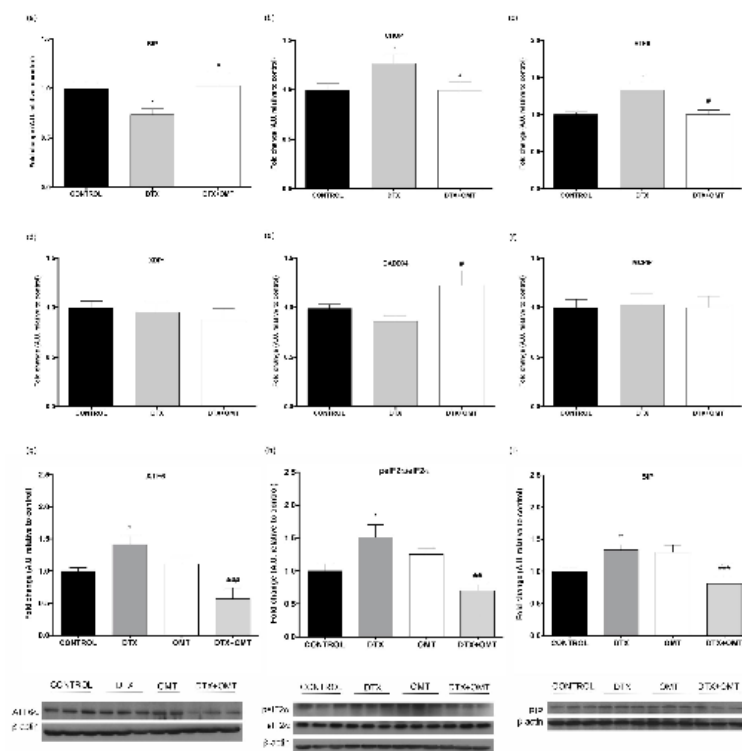
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212782.g003>

Association between obesity and CVDs is well known for a long time, however increased susceptibility of patients with obesity to suffer chemotherapy-induced adverse cardiac events was not well documented until recently. An increased risk of CT as well as higher sensitivity to systolic alterations and mitochondrial dysfunction associated to obesity has been demonstrated in the last years, both in murine models [7, 8] and patients [6], respectively.

Although CT is not easily quantifiable, since most of available data comes from retrospective studies and only in a few cases a prospective evaluation of the cardiac function has been performed, CT is identified as one of the most common complications of current cancer therapies [28]. CT was commonly associated with the use of anthracyclines; however, lately breast cancer cytostatic drugs have also been associated to cardiovascular toxicity [28]. Recent studies suggest possible mechanisms by which CT trigger HF depending on the antineoplastic drug, focusing the origin of CT in oxidative stress-induced cardiomyocyte apoptosis [29]. Cumulative data suggest that mitochondrial cell damage is due to the formation of free radicals and increased oxidative stress, decreased ATP levels, decreased expression of SERCA and ERS induction, structural and functional damage that finally triggers cardiomyocyte death.

Several potential mechanisms such as overdose due to the adjustment to the real weight of the patient [30] or genetic background [31], which also might explain significant co-





**Fig 4. Effect of OMT in ERS gene and protein expression in H9c2 treated with DTX.** mRNA levels of (A) BIP, (B) CHOP, (C) ATF6, (D) XBP1, (E) GADD34 and (F) MCP1 determined by real-time RT-PCR. Protein levels of (G) ATF6o, (H) p-eIF2α/eIF2α ratio and (I) BIP determined by western blot. All experiments were performed in H9c2 cells treated with DTX and/or OMT after 24 hours. Data represent the means  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. Statistical significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control; #, ##, ### $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 DTX-OMT vs. DTX.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212782.g004>

occurrence of CVD with multiple types of cancers independently of behavioural risk factors [32] have been suggested in the relationship between obesity and CT. Among them, changes in the endocrine function of adipose tissue and circulating adipokine levels associated with obesity seem to play a key role increasing the susceptibility to develop CT [9, 10].

Recent data showed that *in vitro* anthracycline-induced cardiomyocyte apoptosis is counteracted through the inhibition of oxidative stress by OMT [10], an adipokine released by visceral depots and down-regulated in patients with obesity [14]. Several studies show a tight relationship between circulating OMT levels and cardiovascular health. Low levels of OMT are linked with CAD, HF, AMI and ischemic disease in patients with type 2 diabetes mellitus [11, 12]. Previous reports have demonstrated a protective effect of OMT as therapeutic agent for CVD [33]. As it was previously reported, OMT reduces apoptosis in H9c2 treated with doxorubicin [10], it also reduces apoptosis in rat cerebral ischemic conditions [34] and in mice subjected to myocardial ischemia followed by reperfusion [13]. In HUVEC cells, OMT increased differentiation into vascular-like structures and decrease apoptotic activity under conditions of serum starvation [35].

In this study, we demonstrated that OMT significantly reduces DTX-induced both necrosis and apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts, as it was shown with doxorubicin [10]. Our data demonstrated a noticeable increase in oxidative stress and ERS in H9c2 cardiomyoblasts treated with DTX, accompanied by a pronounced decrease in cell viability, as it was previously described [24–26]. DTX induced caspase-3-dependent apoptosis was previously described in human prostate cancer cell line [36], human oral squamous cell carcinoma cell lines [37], breast and ovary carcinoma cells [38], but to the best of our knowledge, this is the first time that direct action of DTX on H9c2 cells is associated with increased caspase-3 activity and increased cell death.

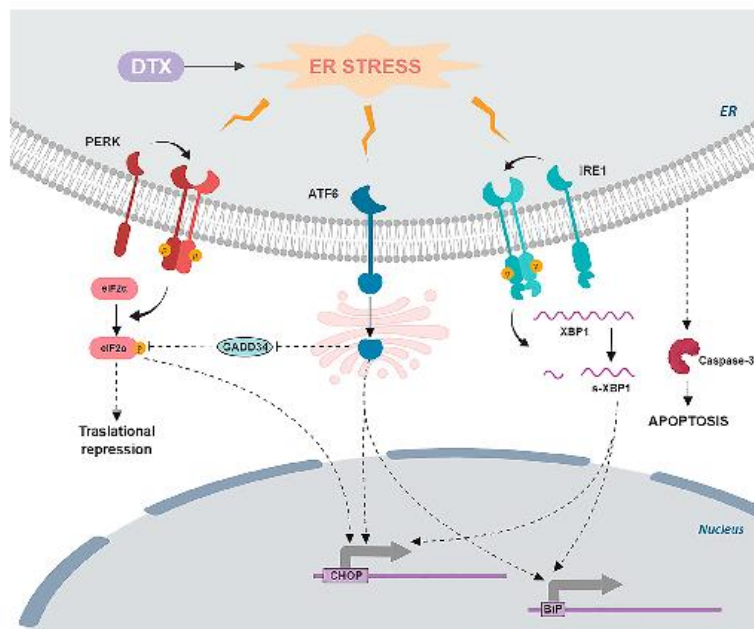
Oxidative stress plays a central role in cardiomyocyte death in several adverse cardiovascular events [39]. NADPH oxidases (NOX) are the major source of  $O_2^{\cdot -}$  production, NADPH oxidase 2 (NOX2) and 4 (NOX4) are both expressed in cardiac muscle. It has been previously described that upregulation of NOX4 by hypertrophic stimuli increases apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. NOX4 has also been demonstrated to be an important source of oxidative stress in the failing heart [40]. Previous data demonstrated that DTX treatment increased NOX activity in HUVEC cells resulting in ROS formation [24] whereas OMT inhibits NOX activity in vascular smooth muscle cells after tumour necrosis factor alpha and platelet-derived growth factor treatment [23, 41]. We therefore studied whether DTX might also caused an increase in oxidative stress that justify increased cardiomyocytes death and whether OMT could also counteract the increase of stress as in vascular smooth muscle cells. Our data demonstrated a significant increase in ROS formation in H9c2 cells treated with DTX but failed to show any improvement after treatment with OMT despite the significant decrease in NOX4 expression; NOX1 and NOX2 expressions were not affected in our experimental model (data not shown). Although OMT may influence activity of alternative endogenous anti-oxidative enzymes, including super oxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase [10], our data indicate that the decrease in cell death is not associated to a lower oxidative stress since OMT does not counteract the increase in ROS levels. Oxidative stress, caused by the overproduction of ROS and the decrease in the antioxidant level, is prevented or suppressed by major antioxidant enzymes, including SOD, CAT and GPx. In our study, DTX treatment increases CAT, GPX and SOD1 gene expression, probably as a compensatory response against higher ROS levels or previously described reduced enzymatic activity associated to DTX treatment [42–44]. However, only in the case of SOD1 protein levels that increase is significant. Coherently with the lack of omentin effect on oxidative stress, OMT did not play any role on the expression of antioxidant enzymes in our model. Our data suggest that OMT exerts its protective role through another pathway of damage.

Currently, ERS-mediated cardiomyocyte apoptosis has attracted broad attention, because it has been found to be responsible for the pathophysiology of many CVDs [45]. The ER is an organelle responsible of the folding of secretory and membrane proteins. Different stimuli

cause the accumulation of unfolded and misfolded proteins, dissociating BIP from the three ER transmembrane protein sensors PERKs, ATF6 and IRE1, triggering the unfolded protein response (UPR) [46]. It has been recently published that after a strong or prolonged stimulus, CHOP, caspase-12, and/or JNK-dependent apoptotic signalling pathways are activated. Thus, CHOP apoptotic pathway activates caspase-3 related with Bcl-2 family proteins [45]. Previous data demonstrated that DTX-induced apoptosis is mediated by induction of ERS [25]. Consequently we analysed the expression of genes involved in ERS such as BIP, CHOP, ATF6, XBP1, GADD34 and MCP1P in H9c2 DTX-treated cells and the effect of OMT co-treatment in ERS gene expression. Although, conventionally ER stress response triggers upregulation of BIP [46], our results showed a significant downregulated BIP expression counteracted by OMT. However, according with conventional ERS response BIP protein levels increase after DTX treatment and decrease after OMT/DTX cotreatment. CHOP is a molecule involved in ER stress-induced apoptosis, under non-stressed conditions CHOP expression is low, but increases in response to ER stress through IRE1-, PERK- and ATF6-dependent transcriptional induction [47]. In addition, it has been proposed that ERS signalling, especially mediated by ATF6, induces XBP1 [48] and plays a decisive role in the induction of apoptosis in muscle tissues through activation of caspase-12 and subsequently activated caspase-3 [49]. Our results showed a significant DTX-induced ATF6 upregulation, according to previous data in human melanoma cells [25], accordingly to these results protein analysis also shows an increase in ATF6 $\alpha$  expression after DTX treatment and a decrease after OMT/DTX treatment, and a significant increase in CHOP expression both counteracted after OMT treatment. Increased ATF6 expression is accompanied by a slight, not significant increase, in XBP1 levels that is also inhibited by OMT. Coherently with the role of the DTX as trigger of ERS and according with previous data demonstrating that GADD34 is regulated by DTX in HL60 cells after 24 hours [50], our data showed a marked decrease in GADD34 expression that is recovered when H9c2 are co-treated with OMT. As it was previously shown in prostate cancer cells, DTX treatment in H9c2 cells also increases pelf2 $\alpha$ /elf2 $\alpha$  protein expression, that is reduced after OMT cotreatment [25, 26, 51]. In addition, our data showed also a non-significant increase in the expression of the monocyte chemotactic protein-induced protein (MCP1P) inhibited by OMT. Based on previous data, MCP1P up-regulation is probably associated with a previously described increase in the expression of MCP1 [52] induced by the DTX [53].

Cumulative evidences support the perspective that oxidative and ER stress has a strong connection. Reactive oxygen species are produced as by-products during the protein folding process, impairing redox state, but also, impaired redox state leads to further ER stress since the protein folding process is dependent on redox homeostasis. Therefore, in order to assess if quenching of boosted ROS levels relief the observed ER stress, H9c2 cells were co-treated with N-Acetylcysteine, a ROS scavenger, previously reported as cardioprotective agent against anthracyclines induced toxicity [54]. Our data show that reduction of oxidative stress, associated with NAC pre-treatment, regulates changes in gene expression of CHOP and protein of ATF6 induced by DTX, but not in the other ERS proteins analysed. Our data indicate that the effects of omentin on ERS are not associated with the redox state [55].

In summary, our data showed that DTX has a direct effect on cardiomyoblasts, increasing oxidative and ERS and consequently cell death, suggesting that it could play a direct role in the development of myocardial toxicity. Our data does not clarify whether OMT counteracts or prevents the onset of ERS, but clearly demonstrated that OMT, despite not reducing DTX-induced oxidative stress, counteracts ERS and prevents apoptosis (Fig 5). These data suggest that omentin treatment may contribute to decrease susceptibility to DTX-induced cardiotoxicity. The results obtained in this study will be useful to carry out mechanistic *in vivo* model to explore the possibility of using omentin as a treatment against the cardiotoxicity induced by docetaxel.



**Fig 5. Proposed mechanism of DTX induced cardiotoxicity: Involvement of ER stress.** DTX induces BIP, CHOP, ATF6 expression and reduces GADD34 expression increasing phosphorylated eIF2α levels. Unresolved ER stress will eventually lead to cell death (caspase-mediated apoptosis). Rounded ends indicate inhibitory pathways; arrows indicate stimulatory pathways.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212782.g005>

### Supporting information

**S1 Fig. Effect of NAC in ERS gene and protein expression in H9c2 treated with DTX.** mRNA levels of (A) BIP, (B) CHOP, (C) ATF6, (D) XBP1, (E) GADD34 and (F) MCP1P determined by real-time RT-PCR. Protein levels of (G) ATF6α, (H) p-eIF2α/eIF2α ratio and (I) BIP determined by western blot. All experiments were performed in H9c2 cells treated with DTX after 24 hours and/or pre treated with NAC for 1 hour. Data represent the means ± SEM from at least three independent experiments. Statistical significance \*, \*\* and \*\*\*  $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001 vs. control; #, ##, ###  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 DTX-OMT vs. DTX (TIF)

**S1 Table. Primers for real time qPCR analysis.**  
(DOCX)

**S2 Table. Antibodies used in western blot analysis.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

H9c2 were kindly provided by Dr. F Fernández Avilés from Hosp. Gregorio Marañón.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Data curation:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Formal analysis:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Funding acquisition:** Ricardo Lage, José Ramón González-Juanatey.

**Investigation:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Moisés Rodríguez-Mañero, Isabel Moscoso.

**Methodology:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Project administration:** Ricardo Lage, José Ramón González-Juanatey, Isabel Moscoso.

**Resources:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Software:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Supervision:** Ricardo Lage, José Ramón González-Juanatey, Isabel Moscoso.

**Validation:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Visualization:** Ricardo Lage, Isabel Moscoso.

**Writing – original draft:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Isabel Moscoso.

**Writing – review & editing:** Ricardo Lage, María Cebro-Márquez, Moisés Rodríguez-Mañero, José Ramón González-Juanatey, Isabel Moscoso.

## References

1. Kovesdy CP, Furth SL, Zoccali C, World Kidney Day Steering C. Obesity and kidney disease: hidden consequences of the epidemic. *J Nephrol*. 2017; 30(1):1–10. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0377-y> PMID: 28214961
2. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet*. 2014; 383(9821):999–1008. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61752-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61752-3) PMID: 24984292
3. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003; 348(17):1625–38. <https://doi.org/10.1096/NEJM021423> PMID: 12711737
4. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Vele-Goffin JJ, Friedman ER, Singenard JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin*. 2017; 67(5):378–97. <https://doi.org/10.3322/caac.21406> PMID: 28793097
5. Johnson CB, Davis MK, Law A, Sulpher J. Shared Risk Factors for Cardiovascular Disease and Cancer: Implications for Preventive Health and Clinical Care in Oncology Patients. *Can J Cardiol*. 2016; 32(7):900–7. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.04.008> PMID: 27343745
6. Guenancia C, Lefebvre A, Cardinale D, Yu AF, Laddie S, Ghiringhelli F, et al. Obesity As a Risk Factor for Anthracyclines and Trastuzumab Cardiotoxicity in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-

- Analysis. *J Clin Oncol*. 2016; 34(26):3157–65. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.4846> PMID: 2755891
7. Mitra MS, Donthamsetty S, White B, Mehendale HM. High fat diet-fed obese rats are highly sensitive to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 231(3):413–22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.05.006> PMID: 18674790
  8. Guenancia C, Hachet O, Aboutabl M, Li N, Rigal E, Cottin Y, et al. Overweight in mice, induced by perinatal programming, exacerbates doxorubicin and trastuzumab cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 77(4):777–85. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2995-9> PMID: 26914236
  9. Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, Ohashi T, Daida H, Walsh K, et al. Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2011; 286(37):32790–800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.245986> PMID: 21794958
  10. Kazama K, Okada M, Yamawaki H. Adipocytokine, omentin inhibits doxorubicin-induced H9c2 cardiomyoblasts apoptosis through the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 457(4):602–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.032> PMID: 25600813
  11. Tan YL, Zheng XL, Tang CK. The protective functions of omentin in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta*. 2015; 448:96–106. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.05.019> PMID: 26079253
  12. Smekal A, Vackavik J. Adipokines and cardiovascular disease: A comprehensive review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2017; 161(1):31–40. <https://doi.org/10.5507/bp.2017.002> PMID: 28228651
  13. Katsuka Y, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Enomoto T, Uemura Y, et al. Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMP-activated protein kinase- and Akt-dependent mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(24):2722–33. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.03.032> PMID: 24768874
  14. de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pary J, et al. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes*. 2007; 56(8):1655–61. <https://doi.org/10.2337/db06-1506> PMID: 17329619
  15. Maeda K, Saigo C, Kito Y, Sakurata T, Yoshida K, Takeuchi T. Expression of TMEM207 in Colorectal Cancer: Relation between TMEM207 and Intelectin-1. *J Cancer*. 2016; 7(2):207–13. <https://doi.org/10.7150/jco.13732> PMID: 26819645
  16. Besardi R, Caramanti M, Savini A, Chionini S, Pierantoni C, Onofri A, et al. State of the art for cardiotoxicity due to chemotherapy and to targeted therapies: a literature review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013; 88(1):75–86. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.02.007> PMID: 23622920
  17. Olsen SR. Taxanes and COX-2 inhibitors: from molecular pathways to clinical practice. *Biomed Pharmacother*. 2005; 59 Suppl 2:S306–10. PMID: 16047525
  18. Gunderen GG, Cook TA. Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11(1):81–94. PMID: 10047525
  19. Todaro MC, Onofri A, Qamar R, Patek TE, Carej S, Khandheria BK. Cardiology: state of the heart. *Int J Cardiol*. 2013; 168(2):680–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.03.133> PMID: 23639459
  20. Rohana CC, Mooney SL. Recent progress with microtubule stabilizers: new compounds, binding modes and cellular activities. *Nat Prod Rep*. 2014; 31(3):335–55. <https://doi.org/10.1039/c3np70082a> PMID: 24481420
  21. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res*. 1991; 69(6):1476–86. PMID: 1883272
  22. Kuznetsov AV, Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, Gimm H. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1853(2):276–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.015> PMID: 25450968
  23. Kazama K, Usui T, Okada M, Hara Y, Yamawaki H. Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF- $\alpha$ -induced superoxide production in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2012; 686(1–3):116–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.033> PMID: 22554771
  24. Hung CH, Chen SH, Chu PM, Tsai KL. Docetaxel Facilitates Endothelial Dysfunction through Oxidative Stress via Modulation of Protein Kinase C  $\beta$ : The Protective Effects of Sirtuin-1. *Toxicol Sci*. 2015; 145(1):59–67. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv017> PMID: 25634536
  25. Mhaidat NM, Thome R, Zhang XD, Hershey P. Involvement of endoplasmic reticulum stress in Docetaxel-induced JNK-dependent apoptosis of human melanoma. *Apoptosis*. 2008; 13(12):1505–12. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0276-8> PMID: 18989785
  26. Mathur A, Abdelmageed ZY, Liu X, Kostochka ML, Zhang H, Abdelmageed AB, et al. Subverting ER stress towards apoptosis by nelfinavir and curcumin coexposure augments docetaxel efficacy in



- castration resistant prostate cancer cells. *PLoS One*. 2014; 9(8):e103109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103109> PMID: 25121735
27. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008; 371(9612):569–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60269-X) PMID: 18280327
  28. Curigliano G, Cardinale D, Danti S, Criscollo C, Asayev O, Lantini D, et al. Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(4):309–25. <https://doi.org/10.3322/caac.21341> PMID: 26919185
  29. Spallaro P, Mauri N, Cadeddu C, Madonna R, Mele D, Monte L, et al. A recommended practical approach to the management of anthracycline-based chemotherapy cardiotoxicity: an opinion paper of the working group on drug cardiotoxicity and cardioprotection, Italian Society of Cardiology. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2016; 17 Suppl 1 Special issue on Cardiotoxicity from Anticancer Drugs and Cardioprotection:e64–e92.
  30. Cueva JF, Antolin S, Calvo L, Fernandez I, Ramos M, de Paz L, et al. Galician consensus on management of cardiotoxicity in breast cancer: risk factors, prevention, and early intervention. *Clin Transl Oncol*. 2017; 19(9):1067–78. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1648-8> PMID: 28342058
  31. Brown SA, Sandhu N, Hermann J. Systems biology approaches to adverse drug effects: the example of cardio-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015; 12(12):718–31. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.168> PMID: 26492128
  32. Duarte CW, Lindner V, Francis SA, Schoomans D. Visualization of Cancer and Cardiovascular Disease Co-Occurrence With Network Methods. *JCO Clinical Cancer Informatics*. 2017(1):1–12.
  33. Shibata R, Ohashi K, Murohara T, Ouchi N. The potential of adipokines as therapeutic agents for cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25(4):483–7. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.005> PMID: 25066649
  34. Gu N, Dong Y, Tian Y, Di Z, Liu Z, Chang M, et al. Anti-apoptotic and angiogenic effects of intelectin-1 in rat cerebral ischemia. *Brain Res Bull*. 2017; 130:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.006> PMID: 28017783
  35. Maruyama S, Shibata R, Kikuchi R, Izumiya Y, Rokutanda T, Araki S, et al. Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2012; 287(1):406–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.261818> PMID: 22081606
  36. Ogura T, Tanaka Y, Tamaki H, Harada M. Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptotic caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells. *Int J Oncol*. 2016; 48(6):2330–8. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3482> PMID: 27062738
  37. Iida S, Shimada J, Sakagami H. Cytotoxicity induced by docetaxel in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *In Vivo*. 2013; 27(3):321–32. PMID: 23606687
  38. Hicson J, Ackler S, Klauber D, Bouska J, Ellis P, Foster K, et al. Noninvasive molecular imaging of apoptosis in vivo using a modified firefly luciferase substrate, Z-DEVD-aminoluciferin. *Cell Death Differ*. 2010; 17(6):1003–10. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.205> PMID: 20067500
  39. Wu S, Li Q, Du M, Li SY, Ren J. Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(1–2):81–7. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04540.x> PMID: 17281740
  40. Theocaris T, Philip JL, Razzuque AM, Ludmer N, Li J, Xu X, et al. Regulation of cellular oxidative stress and apoptosis by G protein-coupled receptor kinase-2; The role of NADPH oxidase 4. *Cell Signal*. 2016; 28(3):190–203. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.11.013> PMID: 26631573
  41. Kazama K, Okada M, Yamawaki H. A novel adipocytokine, omentin, inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration through antioxidant mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 306(12):H1714–9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00048.2014> PMID: 24727494
  42. Starenki VP, Vasiliev L, Nikitchenko I, V. Uslenkova NE, Dzuba VN, Medvedeva EP, et al. [Effect of subtherapeutic doses of docetaxel (taxane) on the efficacy of radiotherapy and pro-oxidant-antioxidant balance in rats with Guein's carcinoma]. *Radiats Biol Radiocool*. 2008; 43(6):640–6. PMID: 14963390
  43. Tabaczar S, Pleniak A, Czepiel J, Pasiecka-Zelga J, Gwozdziński K, Kocova-Chyla A. Quercetin attenuates oxidative stress in the blood plasma of rats bearing DMBA-induced mammary cancer and treated with a combination of doxorubicin and docetaxel. *Gen Physiol Biophys*. 2013; 32(4):535–43. <https://doi.org/10.4149/gpb-2013-048> PMID: 24067283
  44. Yang Z, Fong DW, Yin L, Wong Y, Huang W. Liposomes modulate docetaxel-induced lipid oxidation and membrane damage in human hepatoma cells. *J Liposome Res*. 2009; 19(2):122–30. <https://doi.org/10.1080/0898210080232648> PMID: 19235543

45. Zhang Z, Zhao L, Zhou Y, Lu X, Wang Z, Wang J, et al. Taurine ameliorated homocysteine-induced H9C2 cardiomyocyte apoptosis by modulating endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. 2017; 22(5):647–61. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1361-9> PMID: 28229251
46. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016; 529(7586):326–35. <https://doi.org/10.1038/nature17041> PMID: 26791723
47. Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem*. 2012; 151(3):217–9. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr143> PMID: 22210905
48. Tsuru A, Imai Y, Saito M, Kohno K. Novel mechanism of enhancing IRE1alpha-XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Sci Rep*. 2016; 6:24217. <https://doi.org/10.1038/srep24217> PMID: 27052593
49. Asif A, Niu J, Rogers LM, Adams FM, Kolattukudy PE. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291(3):H1411–20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01378.2005> PMID: 16617122
50. Sahin F, Celik HA, Aydin HH, Okdem G, Omay SB, Saydam G. The interaction between taurine and serine/threonine protein phosphatase activities during taxan-induced apoptosis of HL 60 leukemic cells. *Hematology*. 2008; 13(4):215–23. <https://doi.org/10.1179/102453308X315997> PMID: 18796247
51. Avrit T, Vaulieu E, Chevrel E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis*. 2017; 6(8):x373. <https://doi.org/10.1038/onco.2017.72> PMID: 28848078
52. Younce CW, Kolattukudy PE. MCP-1 causes cardiomyocyte death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCP1P. *Biochem J*. 2010; 426(1):43–53. <https://doi.org/10.1042/BJ20090976> PMID: 19925454
53. Qian DZ, Rademacher BL, Pitsenberger J, Huang CY, Myrthue A, Higano CS, et al. CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. *Prostate*. 2010; 70(4):433–42. <https://doi.org/10.1002/pros.21077> PMID: 19866475
54. Fulbright JM, Egas-Bejar DE, Huh WW, Chandra J. Analysis of redox and apoptotic effects of anthracyclines to delineate a cardioprotective strategy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 76(3):1297–307. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2879-4> PMID: 26515054
55. Chong WC, Shestir MD, Eri R. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(4).